



# Régulations immunitaires et cellulaires impliquées dans le maintien et le contrôle des bactéries endosymbiotiques du charançon des céréales du genre *Sitophilus* spp.

Florent Masson

## ► To cite this version:

Florent Masson. Régulations immunitaires et cellulaires impliquées dans le maintien et le contrôle des bactéries endosymbiotiques du charançon des céréales du genre *Sitophilus* spp.. Zoologie des invertébrés. INSA de Lyon, 2015. Français. <NNT : 2015ISAL0116>. <tel-01367708>

**HAL Id: tel-01367708**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01367708>**

Submitted on 16 Sep 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

**Régulations immunitaires et cellulaires impliquées dans le maintien et le contrôle des bactéries endosymbiotiques du charançon des céréales du genre *Sitophilus* spp.**

présentée devant  
**L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon**

pour obtenir  
**le grade de Docteur**

**École doctorale :** Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation  
**Spécialité :** Micro-organismes, Interactions, Infections

Par  
**Florent MASSON**

Soutenue le 30/11/2015 devant la Commission d'examen

Jury

Bruno LEMAITRE  
Christine BRAQUART-VARNIER  
Catherine MASSON-BOIVIN  
Claire VALIENTE-MORO  
Abdelaziz HEDDI

Professeur  
Professeur  
Directrice de recherche  
Maître de Conférences  
Professeur

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur

Laboratoire de recherche : Biologie Fonctionnelle Insectes et Interactions (BF2I)

## *INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2011-2015*

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
<b>CHIMIE</b>	<b>CHIMIE DE LYON</b> <a href="http://www.edchimie-lyon.fr">http://www.edchimie-lyon.fr</a> Sec : Renée EL MELHEM Bat Blaise Pascal 3 <sup>e</sup> etage 04 72 43 80 46 Insa : R. GOURDON <a href="mailto:secretariat@edchimie-lyon.fr">secretariat@edchimie-lyon.fr</a>	<b>M. Jean Marc LANCELIN</b> Université de Lyon – Collège Doctoral Bât ESCPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 <a href="mailto:directeur@edchimie-lyon.fr">directeur@edchimie-lyon.fr</a>
<b>E.E.A.</b>	<b>ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE</b> <a href="http://edeea.ec-lyon.fr">http://edeea.ec-lyon.fr</a> Sec : M.C. HAVGOUDOUKIAN <a href="mailto:Ecole-doctorale.eea@ec-lyon.fr">Ecole-doctorale.eea@ec-lyon.fr</a>	<b>M. Gérard SCORLETTI</b> Ecole Centrale de Lyon 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60.97 Fax : 04 78 43 37 17 <a href="mailto:Gerard.scorletti@ec-lyon.fr">Gerard.scorletti@ec-lyon.fr</a>
<b>E2M2</b>	<b>EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION</b> <a href="http://e2m2.universite-lyon.fr">http://e2m2.universite-lyon.fr</a> Sec : Safia AIT CHALAL Bat Atrium- UCB Lyon 1 04.72.44.83.62 Insa : S. REVERCHON <a href="mailto:Safia.ait-chalal@univ-lyon1.fr">Safia.ait-chalal@univ-lyon1.fr</a>	<b>M. Fabrice CORDEY</b> Laboratoire de Géologie de Lyon Université Claude Bernard Lyon 1 Bât Géode – Bureau 225 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.44.83.74 <a href="mailto:Sylvie.reverchon-pescheux@insa-lyon.fr">Sylvie.reverchon-pescheux@insa-lyon.fr</a> <a href="mailto:fabrice.cordey@univ-lyon1.fr">fabrice.cordey@univ-lyon1.fr</a>
<b>EDISS</b>	<b>INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE</b> <a href="http://www.ediss-lyon.fr">http://www.ediss-lyon.fr</a> Sec : Safia AIT CHALAL Bat Atrium – UCB Lyon 1 04 72 44 83 62 Insa : <a href="mailto:Safia.ait-chalal@univ-lyon1.fr">Safia.ait-chalal@univ-lyon1.fr</a>	<b>Mme Emmanuelle CANET-SOULAS</b> INSERM U1060, CarMeN lab, Univ. Lyon 1 Bâtiment IMBL 11 avenue Jean Capelle INSA de Lyon 696621 Villeurbanne Tél : 04.72.11.90.13 <a href="mailto:Emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr">Emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr</a>
<b>INFOMATHS</b>	<b>INFORMATIQUE ET MATHEMATIQUES</b> <a href="http://infomaths.univ-lyon1.fr">http://infomaths.univ-lyon1.fr</a> Sec :Renée EL MELHEM Bat Blaise Pascal 3 <sup>e</sup> etage <a href="mailto:infomaths@univ-lyon1.fr">infomaths@univ-lyon1.fr</a>	<b>Mme Sylvie CALABRETTO</b> LIRIS – INSA de Lyon Bat Blaise Pascal 7 avenue Jean Capelle 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 43. 80. 46 Fax 04 72 43 16 87 <a href="mailto:Sylvie.calabretto@insa-lyon.fr">Sylvie.calabretto@insa-lyon.fr</a>
<b>Matériaux</b>	<b>MATERIAUX DE LYON</b> <a href="http://ed34.universite-lyon.fr">http://ed34.universite-lyon.fr</a> Sec : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Direction 1 <sup>er</sup> et. <a href="mailto:Ed.materiaux@insa-lyon.fr">Ed.materiaux@insa-lyon.fr</a>	<b>M. Jean-Yves BUFFIERE</b> INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Saint Exupéry 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 71.70 Fax 04 72 43 85 28 <a href="mailto:Ed.materiaux@insa-lyon.fr">Ed.materiaux@insa-lyon.fr</a>
<b>MEGA</b>	<b>MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE</b> <a href="http://mega.universite-lyon.fr">http://mega.universite-lyon.fr</a> Sec : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Direction 1 <sup>er</sup> et. <a href="mailto:mega@insa-lyon.fr">mega@insa-lyon.fr</a>	<b>M. Philippe BOISSE</b> INSA de Lyon Laboratoire LAMCOS Bâtiment Jacquard 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72 .43.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 <a href="mailto:Philippe.boisse@insa-lyon.fr">Philippe.boisse@insa-lyon.fr</a>
<b>ScSo</b>	<b>ScSo*</b> <a href="http://recherche.univ-lyon2.fr/scso/">http://recherche.univ-lyon2.fr/scso/</a> Sec : Viviane POLSINELLI Brigitte DUBOIS Insa : J.Y. TOUSSAINT <a href="mailto:viviane.polsinelli@univ-lyon2.fr">viviane.polsinelli@univ-lyon2.fr</a>	<b>Mme Isabelle VON BUELTZINGLOEWEN</b> Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.77.23.86 Fax : 04.37.28.04.48 <a href="mailto:isavonb@dbmail.com">isavonb@dbmail.com</a>

\*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

# REMERCIEMENTS

Une thèse est avant tout le résultat du travail collectif de tous ceux qui, à divers degré, ont participé à faire émerger de nouvelles idées, ont aidé techniquement ou moralement. Qui ont apporté une pierre à l'édifice parfois sans même le savoir. Dans cette perspective, remercier toutes les personnes qui ont influencé positivement mon travail ces dernières années sans oublier que ce soit me paraît une entreprise à haut risque. Je me lance tout de même en espérant du fond du cœur que les éventuels oubliés sauront me pardonner.

La première personne que je souhaite remercier est mon directeur de thèse, Abdelaziz Heddi. Merci d'abord pour ton encadrement, tes conseils, l'ouverture scientifique que tu m'as apportée. Merci aussi de m'avoir toujours poussé à aller un peu plus loin dans ma réflexion et ma rédaction, *encore un peu plus loin, encore un peu, allez plus loin encore... !*

Je remercie également Anna Zaidman-Rémy qui s'est particulièrement impliquée dans la direction scientifique de ma thèse. Merci pour toutes les discussions, toutes les idées qui en ont émergé, et pour ta disponibilité.

Un grand merci également à mon jury, Bruno Lemaitre, Christine Braquart-Varnier, Catherine Masson-Boivin et Claire Valiente-Moro. C'est pour moi un honneur et un immense plaisir que vous ayez accepté d'évaluer mon travail.

Qu'est-ce qu'un thésard sans équipe ? Pas grand-chose ! Merci à l'équipe SymSIImm pour avoir si bien réussi au quotidien à mêler bonne humeur et fous rires à une compétence professionnelle exceptionnelle, Carole « la Luciole » Vincent-Monégat, Séverine « la Sardine » Balmand, Agnès « la Tigresse » Vallier, Justin « le Pangolin » Maire, Catherine « la Zibeline » Fiol et Sergio « el Lobo » López-Madrigal. Un merci spécial à Aurélien Vigneron, l'Exilé de la Côte Est et à Marjolaine Rey, l'Exilée de l'Autre Côté du Campus. Merci à l'ensemble des membres du laboratoire BF2I, avec qui j'ai interagi avec plaisir pendant plus de trois ans. C'est avec un pincement au cœur que je quitte cet endroit, et je serai heureux de vivre une expérience ne serait-ce que qu'à moitié aussi enrichissante dans un autre laboratoire.

Merci également à toutes les personnes rencontrées sur le chemin et avec qui j'ai partagé mes résultats, un verre ou juste un peu de temps : mon comité de pilotage, François Leulier, Patrick Mavingui, Marylène Poirié ; Cristina Vieira et Clément Goubert ; Wolfgang Miller et Daniela Schneider ; Camille Détrée ; Caroline Anselme ; Anna Malacrida et Grazia Savini ; Johana Revel et Vincent Dani ; Carlos Vargas-Chavez et Mariana Reyes-Prieto.

Enfin, un énorme merci à mes parents pour leur soutien indéfectible quelles que soient mes décisions, et merci à Ninon, avec qui je vis une expérience de symbiose mutualiste fantastique.

# AVANT-PROPOS

La symbiose était encore récemment perçue comme une curiosité biologique, rare et intrigante. La vision de la biologie et de l'évolution était centrée sur l'espèce, dans son individualité. La conception des interactions était limitée à des contacts macroscopiques entre individus, ponctuels et non systématiques. Pourtant, l'espèce seule est rarement viable, et les grandes innovations biologiques (*e.g.* émergence des cellules aérobies et des eucaryotes photosynthétiques) ont trouvé leur source dans des associations voire des fusions entre organismes. Chaque espèce, quels que soient son environnement et sa position phylogénétique, est en interaction permanente avec d'autres, parasites, mutualistes, ou commensales. Ces interactions peuvent co-évoluer pendant des millions d'années, sont soumises à la sélection naturelle, et peuvent générer de nouvelles entités présentant des caractères adaptatifs différents de ceux des partenaires pris séparément. L'Évolution est Interaction, résultant en métissages génétiques et éclectisme phénotypique.

Cette thèse s'inscrit dans ce contexte d'omniprésence des interactions entre êtres vivants, phénomène désigné par le mot « symbiose ». Elle se focalise sur le charançon des céréales, *Sitophilus oryzae*, un ravageur de cultures qui doit son pouvoir adaptatif et invasif en grande partie à une interaction mutualiste avec une bactérie intracellulaire, *Sodalis pierantonius*. Cette dernière est hébergée dans des cellules spécialisées, les bactériocytes, qui se regroupent pour former un organe, le bactériome.

D'après André Paillot (1933), « *la symbiose peut être conçue, à l'origine, comme une infection bactérienne au sens pathologique du mot. La lente adaptation de ces bactéries à un même organisme a progressivement diminué leur virulence jusqu'à les rendre complètement inoffensives pour l'hôte.* »

Quels sont alors les mécanismes amenant à cet équilibre symbiotique et assurant la persistance de l'association ? Le système immunitaire de l'hôte semble jouer un rôle clef dans cet équilibre. Le bactériome lui-même est un organe immuno-actif, c'est-à-dire capable de générer une réponse immunitaire

en conditions physiologiques, en présence des endosymbiotes. Il a été montré que le bactériome du charançon exprime un nombre d'effecteurs immunitaires limité, mais suffisant pour contrôler les endosymbiotes et les confiner à l'intérieur de cet organe spécialisé. Cependant, les mécanismes impliqués dans la régulation et la production de ces effecteurs demeurent méconnus, et leurs autres fonctions potentielles n'ont pas été explorées. Au cours de cette thèse, je me suis interrogé sur les caractéristiques de la réponse immunitaire du bactériome. Comment la co-évolution hôte-symbiote a-t-elle façonné le système immunitaire de l'hôte, lui permettant d'assurer à la fois la tolérance, le maintien et le contrôle des symbiotes dans les bactériocytes?

# TABLE DES MATIERES

<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>11</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>13</b>
<b>1. La symbiose .....</b>	<b>14</b>
1.1 Les différents niveaux d'intégration de la symbiose .....	15
1.1.1 Classification des symbioses selon la localisation des symbiotes .....	15
1.1.2 Les endosymbioses primaires .....	17
1.1.3 Les endosymbioses secondaires .....	18
1.2 Particularités évolutives des endosymbioses obligatoires .....	19
1.2.1 L'érosion génomique des endosymbiotes primaires .....	20
1.2.2 Les amants opportunistes : cas des remplacements symbiotiques .....	22
1.3 Le modèle <i>Sitophilus oryzae/Sodalis pierantonius</i> .....	26
1.3.1 Taxonomie et écologie du charançon .....	26
1.3.2 Développement de <i>S. oryzae</i> .....	26
1.3.3 Aspects physiologiques de la symbiose avec <i>S. pierantonius</i> .....	27
1.3.3.1 Intégration de la symbiose au développement de l'hôte .....	27
1.3.3.2 Implication de la symbiose dans la synthèse de la cuticule de l'hôte .....	29
1.3.3.3 Autres aspects mutualistes .....	29
1.3.3.4 Point de vue du symbiote .....	30
1.3.4 Caractéristiques génomiques de <i>S. pierantonius</i> .....	31
<b>2. Mécanismes de contrôle des populations symbiotiques par l'hôte .....</b>	<b>33</b>
2.1 La symbiose est dynamique au niveau de l'individu .....	33
2.2 Contrôle par la disponibilité en nutriments .....	34
2.3 Contrôle par le système immunitaire .....	35
2.3.1 L'immunité innée des insectes .....	36
2.3.1.1 L'immunité humorale .....	36
2.3.1.2 L'immunité locale .....	42
2.3.1.3 L'immunité cellulaire et la phagocytose .....	44
2.3.2 Mécanismes de contrôle intégré de l'immunité .....	45
2.3.2.1 Insuline et stockage énergétique .....	45
2.3.2.2 Régulations par l'ecdysone .....	46



2.3.3	L'apoptose et l'autophagie.....	47
2.3.3.1	L'apoptose.....	47
2.3.3.2	L'autophagie.....	49
2.3.4	Conservation et plasticité du système immunitaire .....	50
2.3.5	Immunité innée et contrôle des endosymbiotes chez <i>S. oryzae</i> .....	53
<b>Chapitre 1.....</b>	<b>55</b>	
<b>Régulation transcriptionnelle de la réponse immunitaire interne du bactériome .....</b>	<b>55</b>	
1.	<i>Introduction à l'étude.....</i>	56
2.	<i>Matériel et méthodes .....</i>	57
2.1	Élevage des charançons.....	57
2.2	Synthèse et injection des ARN double-brin.....	58
2.3	Extractions d'ARN et transcription inverse .....	58
2.4	Quantification des transcrits par RT-qPCR .....	59
2.5	Extraction d'ADN et quantification de <i>S. pierantonius</i> .....	59
2.6	Imagerie par Hybridation In Situ en Fluorescence (FISH) .....	60
3.	<i>Résultats.....</i>	61
3.1	Mise au point des conditions d'injection des ARNdb.....	61
3.2	Identification de gènes contrôlant l'expression de <i>colA</i> .....	63
4.	<i>Discussion et conclusion .....</i>	65
<b>Chapitre 2.....</b>	<b>67</b>	
<b>Les infections systémiques déclenchent une réponse immunitaire locale dans le bactériome larvaire</b>	<b>67</b>	
1.	<i>Introduction à l'étude.....</i>	68
2.	<i>Systemic infection generates a local-like immune response of the bacteriome organ in insect symbiosis.....</i>	70
1.	Abstract.....	71
2.	Background.....	71
3.	Material and Methods .....	73
3.1	Insect rearing, infection, and sample preparation .....	73
3.2	Identification of genes of interest .....	74

3.3	Total RNA extraction and reverse-transcription .....	74
3.4	Real-time RT-qPCR transcript quantification .....	74
3.5	DNA extraction and qPCR bacterial count .....	75
3.6	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH) .....	76
3.7	Statistical analysis .....	76
4.	Results .....	77
4.1	<i>D. dadantii</i> infection triggers an efficient systemic immune response in weevil larvae .....	77
4.2	The bacteriome generates a mild, but effective, immune response following bacterial infection .....	81
4.3	The bacteriome response differs from the gut local immune response .....	84
4.4	The bacteriome response to systemic infections does not affect resident endosymbiotic bacteria .....	86
5.	Discussion .....	87
6.	Acknowledgments .....	90
3.	<i>Principaux résultats et conclusion</i> .....	91
<b>Chapitre 3.....</b>		<b>93</b>
<b>La dynamique endosymbiotique de l'intestin adulte est associée à un bridage de l'immunité .....</b>		<b>93</b>
1.	<i>Introduction à l'étude</i> .....	94
2.	<i>Weevil endosymbiont dynamics is associated with a clamping of immunity</i> .....	96
1.	Abstract .....	97
1.1	Background .....	97
1.2	Results .....	97
1.3	Conclusion .....	98
2.	Background .....	98
3.	Material and Methods .....	100
3.1	Biological material .....	100
3.2	RNA isolation and libraries construction for RNAseq .....	101
3.3	Transcriptome assembly and functional annotation .....	101
3.4	Differential gene expression analysis .....	102
3.4	Total RNA extraction and reverse-transcription .....	102
3.5	Real-time RT-qPCR transcript quantification .....	102
3.6	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH) and immunostaining .....	103

4. Results and discussion .....	104
4.1 RNA sequencing (RNAseq) libraries analysis .....	104
4.2 Analysis of differential gene expression and KEGG terms .....	105
4.3 Apoptotic and autophagic processes driving symbiont elimination are set-up during the symbiotic burst.....	111
4.4 Endosymbionts recycling does not trigger antimicrobial peptide production .....	112
5. Conclusion .....	117
6. Acknowledgements .....	117
3. <i>Principaux résultats et conclusion</i> .....	118
<b>Discussion et Conclusions Générales .....</b>	<b>120</b>
1. L'expression des gènes codant <i>colA</i> et les autres PAMs fait intervenir des mécanismes de régulation originaux et complexes.....	121
2. La dynamique symbiotique contrastée chez les jeunes adultes atteste de l'intégration de l'endosymbiose à la physiologie de l'hôte.....	126
3. Conclusions .....	129
<b>Publications et communications.....</b>	<b>130</b>
<i>Publications dans des revues avec comité de lecture</i> .....	130
<i>Communications orales</i> .....	131
<i>Communications affichées</i> .....	131
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>132</b>
<b>Annexes – Chapitre 1.....</b>	<b>160</b>
<b>Annexes – Chapitre 2.....</b>	<b>161</b>
<b>Annexes – Chapitre 3.....</b>	<b>166</b>

# *LISTE DES ABREVIATIONS*

**ADN** : Acide **D**ésoxyribo**N**ucléique  
**ADNc** (cDNA) : Acide **D**ésoxyribo**N**ucléique complémentaire  
**AMP** : Anti**M**icrobial **P**eptide  
**ANOVA** : **A**Nalysis **O**f **V**ariance  
**ARN** : Acide **R**ibo**N**ucléique  
**ARNdb** : **ARN** double-brin  
**ATG** : **Au**Tophagy-related **G**ene  
**CIR** : Catalase **I**mmuno**R**éactive  
**ColA** : Coléoptéricine **A**  
**DAP** : acide **D**i**A**mino**P**imélique  
**DAPI** : 4',6-**D**i**A**midino-2-**P**henyl**I**ndole  
**DEG** : **D**ifferentially **E**xpresse **G**enes  
**DNase** : **D**ésoxyribo**N**ucléase  
**DREDD** : **D**eath **R**Elated ced-3/**N**e**DD**2-like caspase  
**DRO** : **D**érivé **R**éactif de l'**O**xygène  
**DuOx** : **D**ual **O**xyénase  
**ECSIT** : **E**volutionarily **C**onserved **S**ignaling **I**ntermediate **I**n **T**oll pathway  
**EFG** : **E**pithelium **G**rowth **F**actor  
**EIGL2** : **E**cdysone **I**nducible **G**ene **L**2  
**FADD** : **F**as-**A**ssociated **D**eath **D**omain  
**FDR** : **F**alse **D**iscovery **R**ate  
**FISH** : **F**luorescence **I**n **S**itu **H**ybridization  
**Foxo** : **F**orkhead box, sub-group **O**  
**gapdh** : glycéraldéhyde-3-phosphate **d**éshydrogénase  
**GNBP** : **G**ram **N**egative **B**inding **P**rotein  
**IAP** : **I**nhibitor **O**f **A**ptosis  
**iARN** : interference à l'**ARN**  
**IκB** : **I**nhibitor of **κB**  
**IKK** : **I**nhibitor of **κB** **K**inase  
**IMD** : **I**mmune **d**eficiency  
**JAK** : **J**Anus **K**inase  
**JHIP** : **J**uvenile **H**ormone **I**nducible **P**rotein  
**JNK** : c-**J**un **N**-terminal **K**inase  
**kDa** : kiloDalton  
**kb** : kilobase  
**KEGG** : **K**yoto **E**ncyclopedia of **G**enes and **G**enomes

**KOALA** : **KEGG Orthology And Links Annotation**  
**LPS** : **LipoPolySaccharide**  
**MA** : **Millions d'Années**  
**MAMP** : **Microbe Associated Molecular Pattern**  
**Mb** : **Mégabase**  
**miARN** : **micro ARN**  
**MyD88** : **Myeloid Differentiation factor 88**  
**NF-κB** : **Nuclear Factor κB**  
**NGS** : **Next-Generation Sequencing**  
**nuoCD** : **NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit CD**  
**PAM** : **Peptide AntiMicrobien**  
**pb** : **paire de base**  
**PBS** : **Phosphate Buffer Saline**  
**PCR** : **Polymerase Chain Reaction**  
**PGL** : **Protéine Glucagon Like**  
**PGN** : **PeptidoGlycaNe**  
**PGRP** : **PeptidoGlycan Recognition Protein**  
**PIL** : **Protéine Insulin-Like**  
**PIMS** : **PGRP-LC interacting inhibitor of IMD Signaling**  
**PIRK** : **Poor IMD Response upon Knock-in**  
**PRR** : **Pattern-Recognition Protein**  
**qPCR** : **quantitative PCR**  
**RIL** : **Récepteur Insulin-Like**  
**RNase** : **RiboNucléase**  
**RNAseq** : **RNA sequencing**  
**RT-qPCR** : **Real Time quantitative PCR**  
**SI** : **Sequence d'Insertion**  
**SR** : **Scavenger Receptor**  
**STAT** : **Signal-Transducer and Activator of Transcription protein 92E**  
**SST3** : **Système de Sécrétion de Type Trois**  
**SST3-NF** : **Système de Sécrétion de Type Trois Non Flagellaire**  
**TAK** : **TGF-β Activated Kinase**  
**TAMRA** : **TetrAMethylRhodAmine**  
**TGF-β** : **Transforming Growth Factor beta**  
**TLR** : **Toll-Like Receptor**  
**TNF** : **Tumor Necrosis Factor**  
**TollIP** : **Toll Interacting Protein**  
**TOR** : **Target Of Rapamycin**  
**UIM** : **Ultimate Insect Molting**  
**UTR** : **UnTranslated Region**

# *INTRODUCTION*

# 1. La symbiose

Qu'est-ce que la symbiose ?

La définition de ce phénomène a longtemps fait débat dans les milieux scientifiques. Le dictionnaire Larousse, lui, le définit comme « une relation marquée par une union très étroite et très harmonieuse ». Bien que profane, cette définition met en valeur la seule caractéristique qui ait été conservée dans les différentes descriptions que les milieux scientifiques ont faites de la symbiose : l'intimité de la relation. Jusque dans les années 1870, la botanique et la zoologie, mais aussi la microbiologie alors en plein essor, étaient largement investies dans les études d'interactions parasitaires. En 1877, Albert Frank publia une étude sur les interactions entre différentes espèces de lichen, vivant en communauté sans qu'aucune ne souffre de la présence de ses voisines (Frank, 1877). Il introduit alors dans la littérature scientifique le terme « *symbiotismus* », emprunté au vocabulaire profane. La notion de mutualisme, définie en 1876 par Pierre-Joseph van Beneden, n'est pas popularisée à l'époque et n'est pas intégrée au concept développé par Albert Frank. Le terme « symbiose » est repris deux ans plus tard par Anton de Bary, qui le définit alors simplement comme une association établie entre des organismes appartenant à des espèces distinctes, sans évoquer la notion de bénéfice mutuel, ni de durée de l'association (De Bary, 1879).

A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, le terme se popularise dans la communauté scientifique et le sens qu'il doit porter fait débat. L'engouement pour le concept de mutualisme, né de l'étude d'Eugène Warming en 1909, fait du terme « symbiose » un antonyme de « parasitisme » pour de nombreux auteurs. À la fin des années 1960, cette nouvelle définition emporte la majorité des voix, éclipsant celle de Frank et De Bary pendant presque 30 ans (Scott, 1969, Nardon, 1978, Whitfield, 1979, Lewin, 1982, Trager, 1986). Dans les années 1990, la communauté scientifique réalise les similitudes biologiques que partagent les interactions de type parasitaires, commensales et mutualistes, ainsi que la difficulté d'établir une réelle frontière entre elles pour certaines associations, ramenant la définition originale de Frank et De Bary sur le devant de la scène scientifique (Margulis, 1990, Saffo, 1992, Bronstein, 1994, Starr and Taggart, 1998). Après presque 130 ans de discussion sur la terminologie de la symbiose, une large majorité d'auteurs s'accorde aujourd'hui sur une version complétée de celle de Frank et De Bary, décrivant la symbiose

comme une association entre deux ou plusieurs organismes d'espèces distinctes, dans un continuum d'interactions entre le parasitisme et le mutualisme (Heddi et al., 1999, Moran and Wernegreen, 2000, Kremer et al., 2009, Hosokawa et al., 2010, Sachs et al., 2011, Snyder et al., 2011, Brown et al., 2012, Mandyam and Jumpponen, 2015).

---

## 1.1 Les différents niveaux d'intégration de la symbiose

De par leur définition, très vaste, les interactions symbiotiques peuvent être considérées comme omniprésentes dans le monde vivant. Différentes classifications ont été proposées, basées sur la localisation des symbiotes ou sur leur fonction vis-à-vis de l'hôte.

### 1.1.1 Classification des symbioses selon la localisation des symbiotes

Nardon et Grenier (1993) proposent une classification des symbioses en fonction du degré d'intégration du symbiote à l'organisme hôte. Le premier niveau est appelé ectosymbiose, et se caractérise par un symbiote vivant au contact externe ou à proximité de l'organisme hôte. Ce terme regroupe des symbioses macroscopiques, comme le mutualisme entre poissons-clown et anémones de mer, mais aussi des symbioses eucaryotes-micro-organismes, comme chez le ver de Pompéi, *Alvinella pompejana*, un nématode extrémophile vivant autour des monts hydrothermaux de la dorsale Pacifique, qui héberge sur sa cuticule des bactéries filamenteuses fixatrices de soufre (Cary et al., 1997, Le Bris and Gaill, 2007). Le deuxième niveau d'intégration consiste en une internalisation des symbiotes, procaryotes ou eucaryotes unicellulaires, dans l'organisme hôte, que ce soit au niveau des epithelia (milieu externe) ou dans le milieu interne, mais restent toutefois extracellulaires. Ce type d'association, dont la plus représentative est la flore intestinale de nombreux organismes, est appelé endosymbiose. Enfin, les plus fortes intégrations symbiotiques sont les endocytobioses, où le symbiote est hébergé de façon intracellulaire par l'hôte. Ce terme d'« endocytobiose », proposé par Schwemmler en 1980, est en fait très peu usité dans la littérature scientifique. Les anglophones ne font pas de distinction sémantique entre endosymbiose et



endocytobiose, regroupant ces deux types d'interactions sous le terme « endosymbiosis », la symbiose intestinale étant généralement désignée « gut flora » ou « gut microbiota ». Dans un souci de cohérence vis-à-vis de la littérature scientifique, les symbioses intracellulaires seront désignées par le terme d'« endosymbioses » dans ce manuscrit.

Bien que dans la majorité des endosymbioses connues les endosymbiotes soient libres dans le cytoplasme des cellules qui les hébergent, ou confinés dans des vacuoles (Seckbach, 2002), la réalité biologique offre une grande diversité dans les modes d'interaction entre organismes. Chez la cochenille *Planococcus citri*, un endosymbiote  $\beta$ -protéobactérien, *Tremblaya princeps*, héberge lui-même un symbiote  $\gamma$ -protéobactérien, *Moranella endobia*, dans son cytoplasme, formant un système de « poupées russes » dans les bactériocytes de cette cochenille (von Dohlen et al., 2001, Kono et al., 2008, López-Madrigal et al., 2013). Des endosymbiotes ont parfois été décrits dans les organites de cellules spécialisées. C'est le cas de la tique *Ixodes ricinus*, dont les endosymbiotes sont logés dans les mitochondries de cellules ovariennes (Beninati et al., 2004, Sassera et al., 2008). Les spécificités fonctionnelles de cette localisation, ainsi que les processus évolutifs qui ont conduit à la sélection de cette symbiose restent à déterminer. Enfin, la limace marine *Elysia chlorotica* est capable d'intégrer les chloroplastes d'une algue dont elle se nourrit, et de les maintenir dans le cytoplasme de ses propres cellules pour bénéficier de leur activité photosynthétique (West, 1979) ; le chloroplaste étant capable de fonctionner en autonomie en l'absence du noyau de l'algue, cette association est considérée comme une endosymbiose à part entière (Green et al., 2000). Ces exemples d'endosymbioses atypiques, bien que rares, montrent à quel point les interactions hôtes-symbiotes peuvent prendre de multiples formes, et nécessitent un niveau de classification plus détaillé et ne reposant pas uniquement sur la localisation du symbiote dans l'hôte, mais aussi sur la nature de l'interaction. Nardon et Grenier (1993) proposent ainsi de différencier plusieurs classes d'endosymbioses en fonction de l'impact de l'interaction sur la physiologie des partenaires. Ils suggèrent deux grandes catégories : les endosymbioses primaires et secondaires.

### 1.1.2 Les endosymbioses primaires

L'endosymbiose primaire est une association ancestrale strictement obligatoire entre un hôte eucaryote et un endosymbiote microbien. Ces associations sont généralement très anciennes, et les deux partenaires ne peuvent pas survivre l'un sans l'autre. Les endosymbiotes sont ainsi présents chez tous les individus de l'espèce hôte.

Les endosymbioses primaires sont particulièrement abondantes chez les insectes, un des taxons le plus diversifié du monde vivant. Les insectes regrouperaient 30 millions d'espèces différentes (Erwin, 1983), dont plus de 10% seraient directement dépendantes d'endosymbiotes obligatoires pour assurer leur développement et leur reproduction (Buchner, 1965, Douglas, 1989, Moran and Telang, 1998). Ces espèces colonisent souvent des niches écologiques peu compétitives, car nutritionnellement carencées. Parmi les espèces endosymbiotiques les plus étudiées se trouvent des insectes se nourrissant de la sève phloémienne des plantes, comme les pucerons, de l'albumen des céréales, comme les charançons, ou du sang des mammifères comme la mouche tsé-tsé. Chez ces modèles, l'interaction est mutualiste (Douglas and Prosser, 1992) ; le symbiote bénéficie de l'environnement stable offert par le milieu intracellulaire de son hôte, et fournit à ce dernier des nutriments qu'il ne trouve pas dans son alimentation (Wicker, 1983, Wang and Douglas, 1998, Heddi et al., 1999, Akman Gunduz and Douglas, 2009). Cet échange mutualiste confère une fitness améliorée à l'entité symbiotique (Nardon and Grenier, 1991, Douglas and Prosser, 1992, Heddi et al., 1993). Chez plusieurs espèces, les endosymbiotes peuvent être éliminés artificiellement par un traitement aux antibiotiques ou à la chaleur humide, ils ne sont donc pas strictement obligatoires pour l'hôte au niveau individuel, du moins dans les conditions de laboratoire. Toutefois, la diminution drastique de fitness occasionnée par cette élimination permet de considérer l'endosymbiose comme obligatoire au niveau populationnel et évolutif (Nardon, 1973, Nogge, 1976, Douglas, 1989, Wilkinson, 1998).

Les endosymbiotes obligatoires sont transmis verticalement par voie maternelle (Buchner, 1965). Cette étroite relation peut aboutir à une coévolution, voire une cospéciation entre les partenaires (Degnan et al., 2004, Baumann and Baumann, 2005, Mazzon et al., 2010, Hosokawa et al., 2012). Cette coévolution concerne généralement un couple unique d'espèces hôte/endosymbiote.

Pourtant, chez certains modèles, comme la famille des Cicadellidae (Takiya et al., 2006, Wu et al., 2006), le puceron *Cinara cedri* (Lamelas et al., 2011) et la cochenille *Planococcus citri* (von Dohlen et al., 2001, López-Madrigal et al., 2013), au moins deux endosymbiotes primaires ont été identifiés. Les deux montrent des signes de coévolution avec leur hôte et sont indispensables à son développement. Ces exemples ont donné naissance à la notion de symbiotes « co-primaires », illustrant une fois encore la diversité et la complexité des interactions symbiotiques.

### 1.1.3 Les endosymbioses secondaires

Les symbiotes secondaires, parfois appelés symbiotes facultatifs, ne sont pas indispensables à la survie de l'hôte. Ils peuvent être absents chez certaines populations d'une espèce donnée, comme plusieurs symbiotes secondaires d'espèces différentes peuvent coexister au sein d'un même hôte. Contrairement aux symbiotes primaires, les symbiotes secondaires peuvent résider en partie dans l'hémolymph de l'hôte (Fukatsu et al., 2000, Oliver et al., 2010). Ils apportent à l'hôte un bénéfice de type écologique, par exemples en aidant à la spécialisation de l'insecte sur une plante particulière (Tsuchida et al., 2004), en lui conférant un avantage dans la lutte contre les parasites ou les virus (Oliver et al., 2003, Oliver et al., 2005, Moreira et al., 2009, Raquin et al., 2015), ou encore une résistance aux températures élevées (Montllor et al., 2002). Les symbioses secondaires peuvent être transmises par voie maternelle, *via* le sperme, ou être réacquises de l'environnement à chaque génération (Kikuchi et al., 2007, Watanabe et al., 2014). Elles mènent rarement à des phénomènes de cospéciation en raison de la possibilité de transferts horizontaux entre populations, et des échanges génétiques avec des bactéries libres ou d'autres symbiotes. Cependant, leur impact sur la fitness de leur hôte à l'échelle de la population leur confère, comme les endosymbiotes primaires, un rôle prépondérant dans l'évolution des insectes, notamment dans les phénomènes d'adaptation et de spéciation (Moran et al., 2008).

Certains symbiotes facultatifs, comme les bactéries *Wolbachia*, *Cardinium* ou *Spiroplasma*, manipulent la reproduction de l'insecte (Bourtzis and O'Neil, 1998, Johanowicz and Hoy, 1998, Jiggins et al., 2000, Zchori-Fein et al., 2001, Zchori-Fein and Perlman, 2004). *Wolbachia* pourrait infecter entre 30% et 66% des espèces d'arthropodes connues (Duron et al., 2008, Hilgenboecker et al.,

2008). La présence de ce symbiote dans une population affecte ses capacités reproductives à travers quatre phénomènes distincts : l'incompatibilité cytoplasmique, la féminisation, des mâles, l'induction d'une reproduction parthénogénétique et le male-killing, c'est-à-dire la dégénérescence des embryons mâles (Yen and Barr, 1973, Rousset et al., 1992, Stouthamer et al., 1990, Bouchon et al., 1998, Fialho and Stevens, 2000, Arakaki et al., 2001, Dyer and Jaenike, 2004). Ces quatre phénomènes favorisent la dispersion de la bactérie, transmise maternellement, sans apporter de bénéfice écologique démontré à son hôte, menant à la qualification de *Wolbachia* de symbiote « parasite de la reproduction » (Bandi et al., 2001, Duron et al., 2008). Pourtant, des études récentes montrent que certaines populations de *Wolbachia* confèrent des avantages sélectifs à leur hôte, comme les autres symbiotes secondaires. Cela a été démontré chez les moustiques des genres *Aedes* et *Anopheles*, chez qui la présence de *Wolbachia* confère une résistance aux virus de la dengue et du chikungunya, ainsi qu'au parasite *Plasmodium falciparum*, l'agent responsable de la malaria (Bian et al., 2010, Frentiu et al., 2014, Raquin et al., 2015). Une résistance aux virus induite par *Wolbachia* a également été relevée chez la drosophile (Teixeira et al., 2008, Hedges et al., 2008, Chrostek et al., 2013). Chez d'autres modèles, *Wolbachia* serait même devenue indispensable au développement du système reproductif, comme chez *Asobara tabida* (Pannebakker et al., 2007) et certaines souches de *Drosophila melanogaster* (Starr and Cline, 2002). Enfin, il a été montré qu'une souche de *Wolbachia* était capable de réduire sa virulence envers une espèce hôte infectée de longue date, suggérant un certain degré de co-évolution hôte-symbiote dans ce type d'interactions (Braquart-Varnier et al., 2008).

---

## 1.2 Particularités évolutives des endosymbioses obligatoires

Le taux de mutations affectant la fitness des individus est un paramètre lié à la taille et à la structure de la population auquel l'individu appartient (Kondrashov, 1988, Gabriel et al., 1993). Chez les espèces endosymbiotiques primaires, à chaque génération, seule une fraction très limitée de la population bactérienne est transmise à la génération suivante. Ce phénomène de goulot d'étranglement a pour conséquence un rapprochement de la population endosymbiotique d'un état clonal, chez qui les taux de mutations sont plus

élevés que dans les grandes populations (Moran, 1996). De plus, le confinement strictement intracellulaire des bactéries endosymbiotiques primaires les prive de contact avec les bactéries libres de l'environnement, éliminant ainsi la possibilité de recombinaison et d'échange de gènes avec ces dernières. La combinaison de ces deux facteurs conduit à une évolution particulière des génomes de bactéries endosymbiotiques, quand elle est comparée à celle des bactéries libres (Moran, 1996, Fry and Wernegreen, 2005, Kaltenpoth et al., 2010).

### 1.2.1 L'érosion génomique des endosymbiotes primaires

L'évolution accélérée du génome des endosymbiotes se traduit notamment par ce que certains auteurs appellent une « érosion génomique » (Wernegreen and Moran, 1999). Cette érosion génomique, caractérisée par des pertes de gènes, a été principalement observée chez des endosymbiotes à mode de vie intracellulaire strict, lié à un relâchement des pressions sélectives sur le génome de l'endosymbiote. Toutefois, des études récentes font état d'une évolution similaire chez des symbiotes dont le mode de transmission implique une phase extracellulaire (Salem et al., 2015), ou dont le mode de vie est totalement extracellulaire (Kikuchi et al., 2009, Nikoh et al., 2011). Ces nouveaux exemples remettent en cause le mode de vie intracellulaire comme moteur de l'érosion génomique, suggérant que c'est plus précisément la mise à disposition par l'hôte d'un milieu restreint et stable qui en serait la principale pression de sélection.

A quelques exceptions près, l'analyse des tailles de génomes endosymbiotiques soutient l'hypothèse que l'érosion est corrélée à l'ancienneté estimée de l'interaction symbiotique : plus l'interaction est ancienne, plus le génome de l'endosymbiote est réduit. Chez la cicadelle pisseuse *Homalodisca coagulata*, une des plus anciennes symbioses décrites chez les insectes (260 millions d'années), la taille du génome de l'endosymbiote *Candidatus sulcia* est de 246 kb seulement (McCutcheon and Moran, 2007). La taille du génome du symbiote primaire de la mouche tsé-tsé, *Glossina morsitans*, est estimée à 698 kb pour une association datée à 80 millions d'année (Chen et al., 1999, Akman et al., 2002). Enfin, le symbiote du charançon des céréales, *Sitophilus oryzae*, a une taille de génome estimée à 4,5 Mb pour une association datée à 28 000 ans (Lefèvre et al., 2004, Conord et al., 2008, Clayton et al., 2012, Oakeson et al.,

2014). La réduction de taille ne semble pas linéaire en fonction du temps ; l'essentiel des délétions aurait lieu dans un intervalle de temps réduit après l'initiation de l'interaction (Gómez-Valero et al., 2004). Une partie considérable de cette réduction génomique provient de larges délétions accompagnées de réarrangements chromosomiques (Moran and Mira, 2001). Certains gènes sont également éliminés par une érosion graduelle due à l'accumulation de délétions ponctuelles (Moran and Mira, 2001).

Les gènes les plus systématiquement touchés par l'érosion génomique sont ceux codant pour des protéines impliquées dans des voies métaboliques redondantes avec celles de l'hôte. Cette observation est particulièrement bien étayée chez le puceron *Acyrtosiphon pisum*, dont le génome du symbiote primaire *Buchnera aphidicola* est totalement dépourvu des gènes impliqués dans les voies de synthèse des acides aminés non-essentiels, que le puceron est capable de produire ou de se procurer dans son alimentation (Shigenobu et al., 2000, Latorre et al., 2005). Les gènes impliqués dans la virulence bactérienne sont également très souvent absents des génomes de bactéries endosymbiotiques, notamment les gènes impliqués dans la structure et l'assemblage des systèmes de sécrétion de type 3 (SST3) (Dale et al., 2002, Dale et al., 2005). Les SST3 sont des composants essentiels de deux structures bactériennes majeures : le flagelle, et le SST3 Non Flagellaire (SST3-NF). Le SST3-NF, qui serait une adaptation évolutive dérivée du système flagellaire (Abby and Rocha, 2012), est un facteur de virulence majeur des bactéries pathogènes intracellulaires, leur permettant d'injecter des toxines dans des cellules eucaryotes et facilitant leur pénétration dans ces mêmes cellules (Galan and Collmer, 1999). Selon Dale *et al.* (2005), les SST3-NF pourraient être déterminants dans l'endosymbiogenèse, permettant l'intégration intracellulaire de bactéries libres. Ces bactéries, lors de leur coévolution avec l'hôte, auraient perdu les gènes codant pour le SST3-NF suite à un relâchement de pression de sélection, conséquence de leur installation intracellulaire permanente.

Les gènes codant des composants de la paroi et de la membrane bactérienne sont aussi touchés par l'érosion génomique (Gomez-Valero et al., 2004). Ce phénomène priverait notamment la plupart des endosymbiotes de lipopolysaccharide (LPS) et de peptidoglycane (PGN), deux composants bactériens reconnus par le système immunitaire et capables de déclencher son activation. La perte des LPS et PGN aurait pour conséquence un échappement immunitaire du symbiote vis-à-vis de l'hôte, ce qui corrobore l'hypothèse proposée par

André Paillot en 1933 et développée par Dale *et al.* (2002) selon laquelle les bactéries endosymbiotiques seraient des « pathogènes domestiqués », ayant perdu à la fois leur potentiel de virulence et leur faculté à déclencher l'immunité.

Enfin, plusieurs génomes de bactéries endosymbiotiques sont dépourvus de gènes de réparation de l'ADN et de gènes impliqués dans les recombinaisons (Shigenobu *et al.*, 2000, Dale *et al.*, 2003). La perte de ces gènes cause des erreurs non corrigées lors de la réplication, ce qui a pour effet d'augmenter la vitesse d'évolution des génomes, mais aussi de les biaiser dans leur composition chimique. Les bases A et T ont un coût énergétique inférieur à celui des bases G et C, d'où une fréquence naturellement élevée d'erreurs de réplication où une base G ou C est remplacée par A ou T (Moran *et al.*, 2008). L'impossibilité pour les endosymbiotes de corriger ces erreurs aboutit à des génomes fortement biaisés en bases A et T (Moran *et al.*, 2008, Kikuchi *et al.*, 2009, Nikoh *et al.*, 2011, Van Leuven and McCutcheon, 2012). Selon Wernegreen *et al.* (2003), l'association du biais AT et de la perte des gènes de réparation de l'ADN serait un phénomène adaptatif caractéristique des endosymbiotes, leur permettant d'accélérer le façonnement de leur génome tout en minimisant le coût énergétique de la réplication de leur ADN (Wernegreen, 2002).

Si les gènes qui sont délétés sont le plus souvent bien identifiés, le mécanisme qui aboutit à une érosion génomique aussi rapide et systématique n'est pas encore clairement élucidé. Une des hypothèses les mieux soutenues implique l'insertion répétée de séquences mobiles dans le génome de l'endosymbiote. Les séquences d'insertion joueraient un rôle dans la pseudogénisation graduelle de certains gènes, qui est la première phase de leur élimination du génome en conditions de pression sélective réduite (Parkhill *et al.*, 2003, Kresse *et al.*, 2003). Les régions régulatrices sont également touchées par ce phénomène de réduction, aboutissant à une perte de promoteurs et à la formation de régulons (Moran and Mira, 2001).

### 1.2.2 Les amants opportunistes : cas des remplacements symbiotiques

L'examen des arbres phylogénétiques des insectes et de leurs endosymbiotes montre souvent une grande congruence, indiquant une co-évolution, voire une

co-spéciation, entre l'hôte et son symbiote (Chen et al., 1999, Clark et al., 2000). Bien que les systèmes endosymbiotiques semblent intuitivement très stables du fait de l'adaptation extrême des deux partenaires l'un à l'autre, Moran et Baumann ont suggéré dès 1994 la possibilité que les symbiotes primaires puissent être remplacés dans leur fonction par un symbiote secondaire si l'hôte venait à changer de niche écologique (Moran and Baumann, 1994).

### Bacterial phylogeny

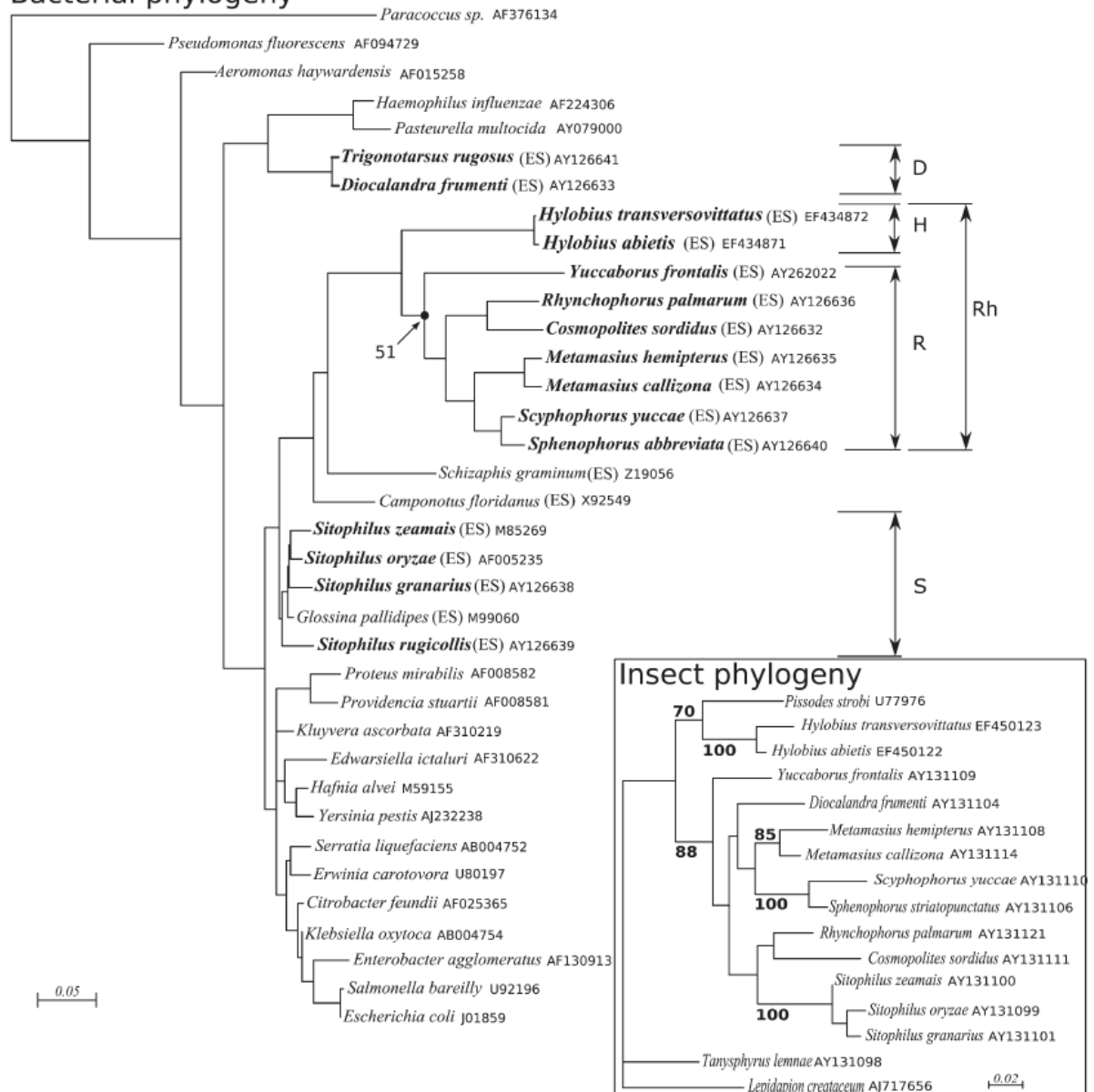


Figure 1 – Phylogénie des endosymbiotes des Dryophthoridae et de leurs hôtes.

(ES) indique les bactéries endosymbiotiques, les autres bactéries sont des espèces libres. Les endosymbiotes du clade ancestral Rh, constitué du clade R des endosymbiotes de Dryophthoridae et du clade H des Hylobius, auraient été remplacés récemment par les endosymbiotes des clades D et S. D'après Conord et al. (2008).



Dix ans plus tard, ce sont les travaux sur les charançons de la famille des Dryophthoridae, à laquelle appartiennent les charançon des céréales, qui ont montré que ce schéma évolutif était possible (Lefèvre et al., 2004). Chez cette famille, trois clades d'endosymbiotes (R, S et D) ont pu être définis (Figure 1). Le clade R, ancestral et monophylétique, comprend la majorité des espèces étudiées. Les bactéries associées à ce clade, nommées *Candidatus Nardonella*, présentent un fort biais en bases A et T. Une phylogénie basée sur la datation d'insectes fossiles a permis d'estimer l'âge de ce clade R à 125 MA (Lefèvre et al., 2004, Conord et al., 2008). Le clade S et le clade D, respectivement retrouvés chez un et deux genres de Dryophthoridae seulement, ne montrent pas de biais en bases A et T, et sont séparés du clade ancestral de *Candidatus Nardonella* par d'autres symbiotes d'insectes. Cette polyphylie suggère que les clades D et S se seraient établis récemment, probablement par remplacement de *Candidatus Nardonella* par les symbiotes actuels des clades S et D (Lefèvre et al., 2004). Le clade S, qui comprend les endosymbiotes du genre *Sodalis*, est le clade le plus récent du groupe étudié. La date de remplacement de *Candidatus Nardonella* par *Sodalis* est sujette à débat : tout d'abord estimée à -20 MA (Lefèvre et al., 2004), elle a été récemment ré-estimée -28 000 ans selon Clayton *et al.* (2012). Ce remplacement pourrait être encore plus récent, basé sur l'hypothèse qu'il aurait été concomitant à la spécialisation du charançon du genre *Sitophilus* sur les céréales de grande culture (blé, riz). Bien que cette hypothèse ne soit pour le moment pas démontrée, elle impliquerait un remplacement symbiotique ayant eu lieu à l'avènement de l'agriculture et de la sélection variétale, soit il y a seulement 10 000 à 15 000 ans, période à laquelle le volume et la qualité des graines de céréales ont pu permettre d'accueillir les larves de *Sitophilus*.

Le remplacement symbiotique chez *Sitophilus* a été un des premiers décrits dans la littérature scientifique, mais l'avancée des techniques de génomique comparative a permis au cours des dernières années de mettre en évidence plusieurs autres exemples. Ainsi en 2010, Toju *et al.* ont identifié un deuxième remplacement symbiotique, toujours dans la famille des Dryophthoridae. Ce remplacement aurait été opéré chez le genre *Curculio*, qui aurait remplacé *Candidatus Nardonella* par *Candidatus Curculioniphilus* lorsque l'espèce s'est spécialisée dans la colonisation des Fagacées (chênes, hêtres, châtaigniers) (Toju et al., 2010). Dans la famille des Adelgidae (chermès), des analyses phylogénétiques ont permis d'identifier au moins trois événements de

remplacement symbiotique en seulement 60 MA (Toenshoff et al., 2012). Les cas de remplacement décrits dans la littérature scientifiques appuient la théorie du remplacement d'un symbiote primaire ancestral par un symbiote secondaire, ou une bactérie libre, lors d'un changement de niche écologique, en particulier un changement de niche trophique. Le symbiote primaire, au génome réduit et adapté à l'ancienne niche, n'aurait plus été à même de fournir à l'hôte les nutriments qui faisaient défaut dans le nouvel environnement de l'insecte. Le symbiote secondaire (ou la bactérie libre), au génome peu ou pas dégénéré, aurait alors été plus compétitif métaboliquement que le symbiote primaire, qui se serait vu remplacé progressivement au fil des générations. Cette hypothèse, principalement inférée à partir de l'observation de systèmes symbiotiques où les remplacements ont eu lieu il y a plusieurs millions d'années, est fortement soutenue par le modèle du puceron *Cinara cedri*. Les pucerons sont un groupe d'insectes hémiptères très diversifié, vivant tous avec le symbiote primaire *Buchnera* qui leur permet de se développer sur la sève phloémienne des plantes. La symbiose avec *Buchnera* a été estimée à 160-280 MA (Moran et al., 1993), et fait partie des plus anciennes symbioses d'insectes décrites. À la différence des autres aphides, vivants majoritairement sur les plantes angiospermes, *Cinara cedri* se développe sur la sève des conifères. La complémentation nutritionnelle fournie par *Buchnera* est insuffisante pour cette niche trophique et un symbiote secondaire, *Serratia symbiotica*, assure une partie de la complémentation nutritionnelle de *Cinara cedri* (Lamelas et al., 2011). *Serratia symbiotica*, classé comme symbiote secondaire, mais devenu indispensable au développement de son hôte, est ainsi qualifié par les auteurs de « chaînon manquant » entre la symbiose secondaire et la symbiose primaire, donnant la vision d'un remplacement symbiotique potentiellement « en cours » (Lamelas et al., 2011).

Ces différents exemples montrent que l'endosymbiose n'est pas un phénomène stable et figé au cours de l'évolution. Le statut endosymbiotique apparaît fortement dépendant de l'environnement de l'hôte : les symbiotes primaires, du fait de leur génome dégénéré, montrent peu de résilience en cas de changement d'environnement. Cela suggère une forte dynamique des interactions hôte-endosymbiote chez les insectes, rythmée par les phénomènes de spéciation.

---

## 1.3 Le modèle *Sitophilus oryzae*/*Sodalis pierantonius*

### 1.3.1 Taxonomie et écologie du charançon

Les charançons du genre *Sitophilus* sont de petits insectes de 2 à 4 mm de long, appartenant à l'ordre des Coléoptères. Les Coléoptères forment le clade le plus riche du monde vivant, englobant à lui seul un quart des espèces, et présentant une grande diversité morphologique, écologique et comportementale. Les Coléoptères seraient apparus il y a 285 MA (Grimaldi and Engel, 2005). Ils sont tous porteurs d'une première paire d'ailes fortement sclérotisées, les élytres. Les élytres leur fournissent une importante protection mécanique et une barrière physique de protection contre les pathogènes, tout en préservant leur capacité de vol ; elles pourraient être en grande partie responsables de la super-radiation évolutive des Coléoptères, leur permettant de coloniser une palette très diverse de niches écologiques (Grimaldi and Engel, 2005).

Le genre *Sitophilus* appartient à la famille des Dryophthoridae, qui contient 140 genres (Hundsdoerfer et al., 2009) confondus sous le nom vernaculaire de « charançon », ou plus rarement de « balanin ». Il se décompose en 15 espèces dont les trois plus étudiées, *S. oryzae*, *S. zeamais* et *S. granarius* sont spécialisées dans un développement sur céréales (Plarre, 2010). Leur nom d'espèce fait référence à leur céréale de prédilection, respectivement le riz, le maïs et le blé, bien que les trois espèces soient capables de se développer sur les trois types de céréales. Cette thèse se concentre sur l'étude de *S. oryzae*, une espèce à répartition ubiquitaire, bien que préférant les régions tropicales et subtropicales. Les adultes infestent aussi bien les céréales en champ que les céréales stockées, pouvant causer une perte de récolte allant dans certaines régions jusqu'à 90% (Giga et al., 1991, Demissie et al., 2008).

### 1.3.2 Développement de *S. oryzae*

*S. oryzae* est un insecte holométabole ; les stades larvaire et adulte (imaginal) sont morphologiquement et écologiquement très différents, et séparés par une phase de métamorphose complète. La femelle adulte creuse les grains à l'aide de son rostre, dépose un ou plusieurs œufs dans l'endosperme de la graine, et rebouche le trou à l'aide d'une sécrétion mêlant de la salive et de la farine. Les

stades embryonnaire, larvaire et nymphal se développent à l'intérieur du grain, sur une durée d'environ 28 jours à 27°C. La larve est ronde, blanche, sans appendice à l'exception d'une capsule céphalique fortement chitinisée et de mandibules lui permettant de se nourrir de l'endosperme de la graine. Elle passe par quatre stades de développement, séparés par des mues. A la fin du dernier stade larvaire, elle entre en stade pré-nymphal, caractérisé par un allongement et par la perte de la capsule céphalique. La métamorphose dure trois à quatre jours à 27°C, et produit un imago sexuellement immature. Il faut environ trois jours au jeune imago pour sortir du grain en le forant avec son rostre, et encore une semaine après émergence pour atteindre la maturité sexuelle et reproduire le cycle. Les adultes ont une durée de vie de quelques mois (environ six mois en laboratoire), et les femelles sont fertiles toute leur vie, bien que le nombre d'œufs viables pondus décroisse avec l'âge.

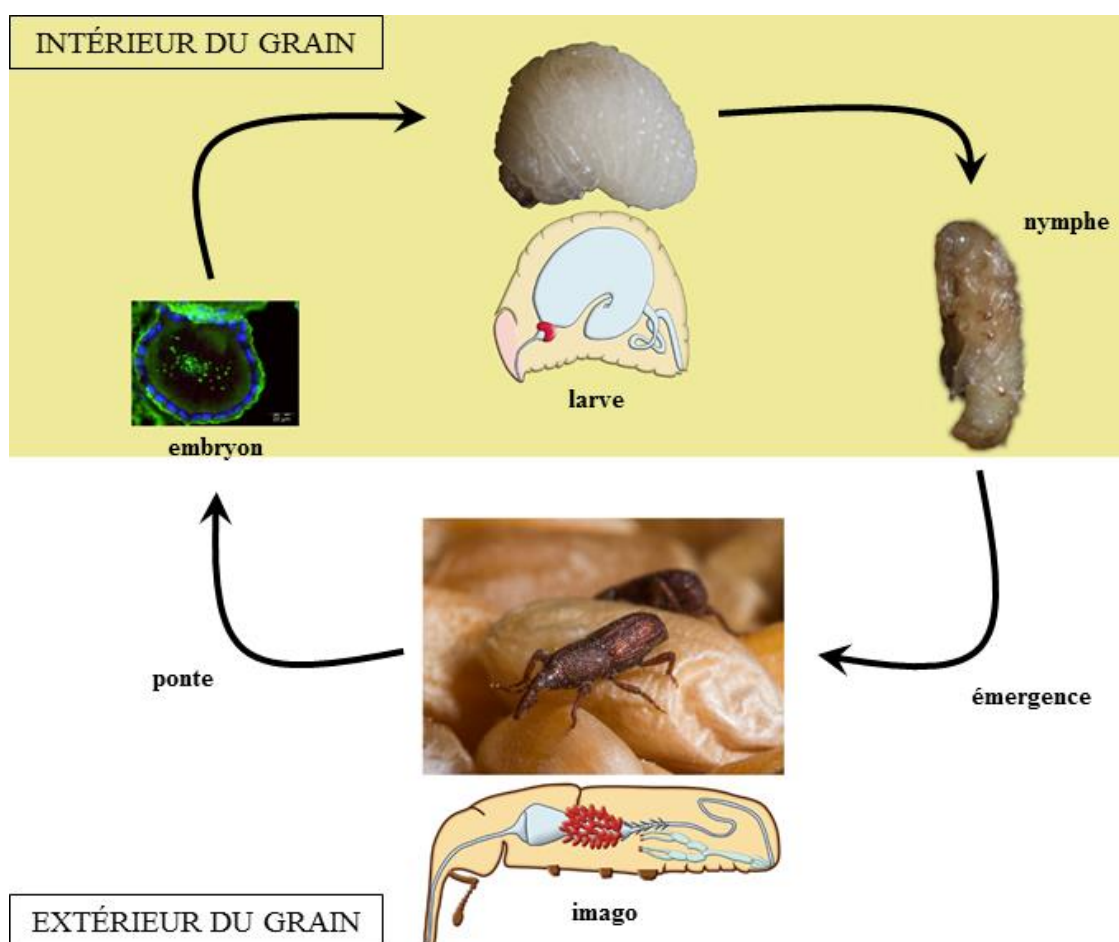
### 1.3.3 Aspects physiologiques de la symbiose avec *S. pierantonius*

Le genre *Sitophilus* est porteur d'un symbiote  $\gamma$ -protéobactérien intracellulaire obligatoire, *Sodalis pierantonius* (anciennement appelé *Sitophilus* Primary Endosymbiont – SPE) (Pierantoni, 1927, Heddi et al., 1998). En plus de ce symbiote nutritionnel, environ 57% des souches de *Sitophilus* hébergent un symbiote secondaire du genre *Wolbachia* (Heddi et al., 1999). Étonnamment, malgré de nombreuses approches de biologie moléculaire et d'imagerie, aucune flore intestinale n'a été observée chez le genre *Sitophilus*, faisant du modèle un système symbiotique bi- ou tripartite relativement simple.

#### 1.3.3.1 *Intégration de la symbiose au développement de l'hôte*

*S. pierantonius* est pleinement intégré à la physiologie et au développement de *S. oryzae*. Il est hébergé sous forme libre dans le cytoplasme de cellules spécialisées, les bactériocytes. Les bactériocytes sont regroupés sous la forme d'un organe, le bactériome (Buchner, 1965), dont la forme et la localisation varient avec le développement de l'insecte (Figure 3). Au stade larvaire, le bactériome prend la forme d'un organe bilobé, attaché à la jonction de l'intestin antérieur et de l'intestin moyen. Sa taille augmente légèrement pendant la maturation de la larve, sans changement de forme. Au stade nymphal, le

bactériome larvaire se désintègre, le stade adulte étant caractérisé par une multitude de bactériomes plus petits, situés à l'extrémité des caeca mésentériques (Figure 2) (Nardon and Wicker, 1981). Les bactériomes imaginaux grossissent jusqu'au troisième jour suivant l'émergence de l'individu hors du grain, phénomène accompagné d'une augmentation du nombre de symbiotes, puis les bactériomes régressent jusqu'à leur élimination totale de l'intestin à partir du onzième jour après l'émergence (Figure 2) (Vigneron et al., 2014). Seule une petite population de symbiotes est conservée



**Figure 3 – Cycle de développement des charançons du genre *Sitophilus*.**

La femelle pond un ou plusieurs œufs infectés par *S. pierantonius* à l'intérieur d'un grain de céréale, où ont lieu les stades larvaires. Les endosymbiotes sont hébergés dans un bactériome unique situé à l'entrée de l'intestin moyen de la larve. En début de nymphose, le bactériome larvaire régresse au profit d'une multitude de bactériomes situés à l'extrémité des caeca mésentériques du jeune adulte. Le jeune adulte émerge du grain au bout d'environ 28 jours. Les endosymbiotes intestinaux sont éliminés à la fin de la synthèse de sa cuticule, seuls les endosymbiotes ovariens sont maintenus chez les femelles pour assurer la transmission verticale de la symbiose. Les bactériomes sont matérialisés en rouge sur les schémas.

chez la femelle, dans les ovaires, assurant la transmission maternelle de la symbiose (Vigneron et al., 2014).

#### 1.3.3.2 *Implication de la symbiose dans la synthèse de la cuticule de l'hôte*

Un des rôles les plus récemment décrits de *S. pierantonius* dans la symbiose avec le charançon est son implication dans la synthèse de la cuticule de l'hôte (Vigneron et al., 2014). A sa sortie de métamorphose, le jeune imago a une cuticule immature, fine, caractérisée par une couleur claire. La synthèse d'une cuticule épaisse et tannée requiert de grandes quantités d'acides aminés aromatiques, la tyrosine et la phénylalanine, présents en quantités très faibles dans les céréales dont se nourrit exclusivement le charançon. Vigneron *et al.* (2014) ont montré que *S. pierantonius* fournissait ces deux acides aminés à son hôte en quantités importantes, lui permettant de construire rapidement une cuticule épaisse et bien sclérotisée. L'augmentation drastique du nombre de symbiotes dans les premiers jours de la vie adulte correspond à l'augmentation des besoins de l'hôte en ces acides aminés. Une fois la cuticule achevée, un précurseur de sa synthèse, la DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine, issue de l'oxydation de la tyrosine), s'accumule et servirait de signal pour déclencher l'élimination des bactériomes mésentériques. L'hôte recycle alors son symbiote par un mécanisme impliquant l'apoptose et l'autophagie. Le recyclage permettrait à l'hôte, en métabolisant les composés cellulaires du symbiote, de récupérer une partie de l'énergie investie lors de la phase de croissance bactérienne. La dynamique symbiotique de *S. oryzae* illustre bien le concept de trade-off (compromis) entre les partenaires de l'entité symbiotique : leur population croît rapidement au stade jeune adulte où les besoins sont très élevés ; puis ils sont éliminés lorsque le coût énergétique de leur maintien devient supérieur au bénéfice que l'hôte peut tirer de la complémentarité nutritionnelle.

#### 1.3.3.3 *Autres aspects mutualistes*

Outre son rôle dans la synthèse de la cuticule de *Sitophilus*, *S. pierantonius* fournit des vitamines à son hôte, notamment de l'acide pantothénique, de la riboflavine et de la biotine (Wicker, 1983). Cette complémentarité nutritionnelle a été étudiée par plusieurs auteurs avec des approches

biologiques et métaboliques (Nardon and Wicker, 1981, Wicker, 1983, Wicker et al., 1985, Gasnier-Fauchet et al., 1986, Heddi et al., 1993). Ces travaux ont montré qu'en supplémentant les vitamines, *S. pierantonius* améliore le métabolisme énergétique mitochondrial de son hôte en augmentant l'activité des enzymes impliquées dans le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale (Heddi et al., 1993, Heddi et al., 1999). L'hôte tire de ce mutualisme plusieurs avantages sélectifs, notamment une accélération de son développement larvaire, une augmentation de sa fertilité, et la capacité de vol des insectes adultes (Nardon and Wicker, 1981, Heddi et al., 1993, Grenier et al., 1994).

#### 1.3.3.4 Point de vue du symbiote

L'interaction de *Sitophilus* avec *S. pierantonius* est décrite dans la littérature comme « mutualiste », ce qui suppose l'existence d'un bénéfice réciproque. Le bénéfice que tire l'insecte de son interaction avec *S. pierantonius* est indiscutablement bien décrit. Cependant, aucune donnée expérimentale n'est disponible sur le bénéfice que peut avoir le symbiote à travers son interaction avec l'hôte, en partie faute de moyens techniques. Les endosymbiotes obligatoires sont généralement non cultivables, et difficiles à appréhender *in vivo* du fait de leur localisation intracellulaire. Les études prenant en compte les bénéfices des symbiotes sont par ailleurs rares quel que soit le modèle (Garcia and Gerardo, 2014). Les auteurs s'accordent sur l'hypothèse que le milieu stable fourni par l'hôte, ainsi que les nutriments de base dont la bactérie bénéficie, seraient les principaux points de mutualisme pour le symbiote. Cependant, la mise en évidence de l'élimination complète des symbiotes des bactériomes intestinaux chez les charançons adultes réitère la question du bénéfice réciproque. Alors que le bénéfice de l'hôte a été mesuré à différentes étapes de son cycle, le bénéfice des symbiotes semble temporaire et directement assujéti aux besoins de son partenaire. La qualification de la symbiose *S. oryzae*/*S. pierantonius* pourrait être plus rapprochée du commensalisme (effet bénéfique pour un des partenaires et neutre pour l'autre), voire d'une forme d'« assujettissement » du symbiote, qui doit adapter son métabolisme et son nombre aux besoins physiologiques de son hôte.

#### 1.3.4 Caractéristiques génomiques de *S. pierantonius*

La jeunesse de la symbiose entre *Sitophilus* et *S. pierantonius* offre la possibilité d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la symbiogenèse et dans les réarrangements génomiques précoces des endosymbiotes (Lefèvre et al., 2004, Conord et al., 2008, Clayton et al., 2012). Le génome de *S. pierantonius* a été très récemment publié (Oakeson et al., 2014), grâce à une collaboration entre notre équipe et celles d'A. Moya (Univ. Valencia) et de C. Dale (Univ. Utah). Bien que *S. pierantonius* présente toutes les caractéristiques physiologiques d'un symbiote obligatoire (confinement intracellulaire, transmission verticale, complémentarité métabolique de l'hôte), son génome est qualitativement plus proche du génome d'une bactérie libre que d'un endosymbiote ancien (Oakeson et al., 2014). Son taux en bases G et C est de 56%, attestant qu'il n'est pas biaisé en bases A-T, à l'instar des symbiotes anciens. Sa taille est de 4,5 Mb, très proche de celles de beaucoup de bactéries libres ; le génome d'*Escherichia coli* a par exemple une taille de 4,6 Mb (Smith 1987). Cependant, presque de la moitié des séquences codantes sont pseudogénisées. De façon remarquable, le génome de *S. pierantonius* possède une quantité inégalée de SI, représentant près de 18% de son génome (Oakeson et al., 2014). Pour comparaison, les plus hauts taux précédemment connus étaient de 6% à 8% chez des bactéries pathogènes strictes capables de se développer uniquement dans leur hôte, tels que les genres *Shigella* et *Orientia* (Jin et al., 2002, Moran and Plague, 2004, Nakayama et al., 2008), et de 10-11% chez certaines *Wolbachia* (Moran and Plague, 2004). Les SI sont décrites comme des facteurs d'accélération de l'évolution des génomes, favorisant de larges réarrangements chromosomiques, et causant des phénomènes de duplication de gènes et de formations de régulons. Elles pourraient aussi être impliquées dans de larges délétions de gènes dans un contexte de pressions de sélection réduites, typique du passage d'un mode de vie extracellulaire à un mode de vie intracellulaire (voir 1.2.1 *L'érosion génomique des endosymbiotes*). Leur multiplication dans les premiers stades de la symbiogenèse accompagnerait le relâchement des pressions sélectives sur le génome du symbiote et faciliterait les phénomènes de pseudogénisation et de réarrangements géniques.



Outre sa grande taille, le génome de *S. pierantonius* présente d'autres différences notables quand il est comparé aux génomes d'endosymbiotes anciens. Il code pour les gènes de réparation de l'ADN, les gènes d'un SST3 partiellement fonctionnel, et les gènes classiquement impliqués dans la synthèse de la paroi des bactéries à Gram-négatif (Oakeson et al., 2014). La conservation de certaines caractéristiques de bactéries libres, associées au taux élevé de SI, seraient ainsi les traits d'un génome d'endosymbiote en cours de dégénérescence.

## 2. Mécanismes de contrôle des populations symbiotiques par l'hôte

---

### 2.1 La symbiose est dynamique au niveau de l'individu

L'endosymbiose est un phénomène dynamique, tant au niveau des populations (Lefèvre et al., 2004, Conord et al., 2008, Toju et al., 2010, Toenshoff et al., 2012) que des individus (Vigneron et al., 2014). La dynamique individuelle, caractérisée par un changement en densité de population et/ou en localisation des endosymbiotes au cours de la vie de l'hôte, a été bien décrite chez *S. oryzae* (Vigneron et al., 2014), mais il ne s'agit pas d'un cas isolé. Chez le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* et la fourmi charpentière *Camponotus floridanus*, la densité symbiotique augmente durant la vie juvénile, et diminue graduellement chez l'adulte mature (Koga et al., 2003, Sakurai et al., 2005, Stoll et al., 2010a). Bien que ça ne soit pas encore démontré chez ces modèles, il a été proposé que cette dynamique soit corrélée aux besoins physiologiques de l'hôte, à l'instar de la situation chez *S. oryzae* (Stoll et al., 2010a). Ces résultats suggèrent que l'hôte possède des mécanismes qui lui permettent d'ajuster au mieux la taille de la population symbiotique à ses besoins physiologiques et développementaux. Chez la cochenille du genre *Planococcus*, porteuse de deux endosymbiotes obligatoires (co-primaires), l'élimination au stade adulte se fait selon une cinétique qui est propre à chacune des deux bactéries, suggérant un contrôle par l'hôte d'une grande finesse et d'une grande spécificité (Kono et al., 2008).

La capacité de certains insectes à maintenir une population d'endosymbiotes à une taille relativement stable à l'état larvaire, puis à faire varier en fonction de leurs besoins physiologiques au stade adulte suggère des mécanismes complexes de contrôle dont plusieurs ont été étudiés. Dans cette partie introductive, je présenterai les deux hypothèses les mieux étayées chez les insectes : le contrôle *via* la disponibilité en nutriments, et le contrôle *via* le système immunitaire de l'hôte.

---

## 2.2 Contrôle par la disponibilité en nutriments

Wilkinson *et al.* (2001) ont montré que la densité de symbiotes facultatifs chez le puceron *Aphis fabae* variait en fonction de la plante sur laquelle l'insecte se développait, plus précisément en fonction de ses apports nutritionnels. Ils établirent ainsi la première corrélation entre nutrition et symbiose, et émirent l'hypothèse que cette corrélation pourrait s'étendre aux endosymbioses obligatoires qui, de par leur localisation intracellulaire et leur transmission strictement verticale, n'ont comme ressources que les nutriments provenant de leur hôte (Wilkinson *et al.*, 2001). Cette hypothèse fut vérifiée par la même équipe en 2007, qui démontra que la densité du symbiote primaire du puceron du pois, *B. aphidicola*, variait en fonction de la quantité d'azote disponible dans le milieu de l'hôte (Wilkinson *et al.*, 2007).

Parmi les voies de signalisation cellulaires permettant d'intégrer un signal nutritif en mécanisme de contrôle des endosymbiotes, la voie Target of Rapamycin (TOR) représente une piste d'étude privilégiée. Elle a d'abord été caractérisée chez les mammifères, chez qui elle permet l'intégration de signaux nutritionnels (Tokunaga *et al.*, 2007) et hormonaux (Hay and Sonenberg, 2004) et régule la prolifération et la croissance cellulaire (Hay and Sonenberg, 2004). Chez les insectes, elle a été identifiée comme acteur principal ou secondaire dans une multitude de processus biologiques, incluant la régulation de la synthèse d'hormone juvénile en fonction de la disponibilité en nutriments (Maestro *et al.*, 2009), le développement des œufs (Roy and Raikhel, 2011), la pigmentation de la cuticule (Shakhmantsir *et al.*, 2014), ou encore la modulation de l'activité immunitaire en fonction du niveau d'activité métabolique (Varma *et al.*, 2014). Un lien direct entre voie TOR et symbiose extracellulaire a été mis en évidence chez *D. melanogaster*, dont la croissance est modulée par l'intégration par la voie TOR de signaux générés par la bactérie intestinale *Lactobacillus plantarum* (Storelli *et al.*, 2011). La voie TOR est aussi impliquée dans l'activation de l'autophagie (Jung *et al.*, 2010), mécanisme observé chez le nématode *Brugia malayi* pour réguler la densité de population du symbiote secondaire *Wolbachia* (Voronin *et al.*, 2012). Bien qu'aucune étude n'ait encore établi de lien direct entre nutrition, voie TOR, autophagie et contrôle des symbioses obligatoires chez les insectes, les données

obtenues sur des modèles à symbiose extracellulaire ou secondaire vont dans le sens de cette hypothèse.

L'hypothèse du contrôle de la densité de population endosymbiotique par l'hôte *via* l'intégration de signaux nutritionnels a cependant ses limites. Elle ne permet pas d'expliquer les variations de densité observées chez certains modèles lors de périodes où leur alimentation est stable. De plus, en l'absence de connexion établie entre l'intégration du signal et des effecteurs clairement identifiés, cette hypothèse ne propose pour le moment aucun mécanisme fonctionnel pour expliquer la régulation des populations endosymbiotiques.

---

## 2.3 Contrôle par le système immunitaire

Les relations endosymbiotiques seraient initiées par l'intégration par l'hôte de bactéries libres, ou pathogènes intracellulaires (Paillot, 1933, Dale et al., 2002, Dale et al., 2005). Selon cette hypothèse, aux premiers temps de la symbiogénèse, l'interaction hôte-symbiote s'apparenterait donc à une infection de type pathogène, qui aurait évolué vers une intégration durable et mutualiste (Paillot, 1933). Durant leur histoire coévolutive, les deux partenaires ont dû s'adapter pour tolérer et être toléré. Du côté des endosymbiotes obligatoires, de nombreux travaux proposent que l'adaptation à l'hôte se traduirait, entre autres, par la perte des gènes codant pour des facteurs de virulence ou des déterminants de la paroi, leur permettant ainsi de ne pas éliciter la réponse immunitaire de l'hôte lorsqu'ils sont dans les bactériocytes (Dale et al., 2002, Gomez-Valero et al., 2004, Dale et al., 2005).

Du côté de l'hôte, chez *S. oryzae* et la fourmi charpentière *Camponotus floridanus*, l'injection expérimentale des endosymbiotes dans l'hémolymphe de l'insecte déclenche la réponse immunitaire de l'hôte (Anselme, 2006, Ratzka et al., 2011), suggérant que la réponse immunitaire systémique ne fait pas de distinction entre les endosymbiotes et des bactéries pathogènes. Ceci suggère qu'une stratégie de compartimentalisation endosymbiotique a été sélectionnée au cours de l'évolution, permettant d'isoler les endosymbiotes de la réponse systémique et les contrôler à travers une réponse immunitaire locale dans le bactériome (Heddi et al., 2005, Anselme et al., 2008, Gross et al., 2009).

### 2.3.1 L'immunité innée des insectes

Les insectes disposent d'une immunité de type innée, et bien que n'incluant pas de défenses adaptatives, leur capacité à répondre aux infections est remarquable, et fait intervenir des voies de signalisation complexes. L'exploration fonctionnelle de l'immunité des insectes a pris son essor dans les années 1990 sur l'organisme modèle *D. melanogaster*. La drosophile présente une réponse immunitaire décrite sous la forme de trois volets distincts : la réponse humorale, la réponse locale, et la réponse cellulaire (Lemaitre and Hoffmann, 2007, Kounatidis and Ligoxygakis, 2012). Ces trois volets seront décrits dans cette partie introductive avec une attention particulière sur les mécanismes de défense contre les bactéries, laissant de côté la défense contre les champignons, les virus et les parasitoïdes.

#### 2.3.1.1 *L'immunité humorale*

La réponse immunitaire humorale fait intervenir des molécules sécrétées dans l'hémolymph. Elle englobe les mécanismes de mélanisation et coagulation, qui ne seront pas développés ici, ainsi que la sécrétion systémique de peptides antimicrobiens (PAMs). Ces effecteurs immunitaires solubles sont synthétisés en grandes quantités par le corps gras (ou tissu adipeux) après induction par des voies de signalisations immunitaires. Le corps gras assure la production mais aussi la sécrétion des PAMs dans l'hémolymph de l'insecte, ou liquide interne, où ils atteignent rapidement des concentrations antibactériennes efficaces pendant plusieurs semaines suivant l'infection (Uttenweiler-Joseph et al., 1998).

Les PAMs sont des effecteurs immunitaires ubiquitaires dans le monde vivant, participant à l'immunité innée des invertébrés, des vertébrés, et des plantes (Zasloff, 2002). Ils présentent une grande variété de structures et de modes d'action, reflétant l'adaptation immunitaire des espèces à l'environnement microbiologique de la niche écologique qu'ils occupent (Simmaco et al., 1998). Chez la drosophile, sept familles de PAMs ont été identifiées. Elles ont toute en commun de regrouper des molécules cationiques de taille inférieure à 10 kDa, à l'exception des Attacines dont le poids moléculaire peut atteindre 25 kDa. Les PAMs de la drosophile partagent un mode d'action commun mais dont

le mécanisme exact est encore mal compris. Ce mécanisme est approximé par le modèle de Shai–Matsuzaki–Huang, qui propose que les PAMs soient capables d’interagir avec la bicouche phospholipidique des membranes bactériennes et de s’y insérer pour former des pores. Une fois intégrés à la membrane, ils pourraient, en fonction de leur structure secondaire, soit déstructurer la membrane pour lyser la cellule mécaniquement, soit pénétrer dans le cytoplasme pour interagir avec les composants cellulaires (Matsuzaki, 1999, Shai, 1999, Yang et al., 2000). Malgré un mode d’action commun, le spectre d’activité de chaque PAM lui est propre, pouvant cibler spécifiquement un type de bactérie (Gram-positif ou Gram-négatif), des champignons, ou plusieurs cibles à la fois (Imler et Bulet 2005).

Chez la drosophile, l’expression des PAMs en réponse à une infection bactérienne est sous le contrôle transcriptionnel de deux voies de signalisation distinctes, la voie Toll et la voie IMD (Figure 3) (De Gregorio et al., 2002). Ces voies sont sujettes à une activation par la reconnaissance de motifs spécifiques de la structure des cellules bactériennes, les Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs). Chez la drosophile, et dans le cas des bactéries, le MAMP reconnu est le peptidoglycane (PGN) (Leulier et al., 2003). L’activation de ces voies lors d’une infection aboutit à l’activation de facteurs de transcription du type NF- $\kappa$ B, (Kadalayil et al., 1997, Petersen et al., 1999, Senger et al., 2004), qui vont à leur tour activer les gènes codants des PAMs au spectre d’action « adapté » au type de pathogène reconnu (Lemaitre et al., 1997). En cas d’infection *in vivo*, les deux voies sont activées simultanément à des degrés variables, la voie contrôlant l’expression des PAMs les plus adaptés au type de pathogène reconnue ayant une activité plus forte que l’autre (Tanji et al., 2007, Lemaitre and Hoffmann, 2007). L’activation simultanée des deux voies aurait pour conséquence d’intensifier la réponse ponctuelle à l’infection, mais aussi de produire une plus grande variété de PAM, et donc d’élargir le spectre d’action de la réponse, permettant d’éviter une éventuelle surinfection par des pathogènes différents de ceux de l’infection originale. La synthèse simultanée de plusieurs types de PAMs serait aussi un moyen évolutif pour réduire le coût énergétique de la réponse immunitaire, un cocktail de différentes molécules à faible concentration étant plus efficace que la production massive d’un seul PAM (Rahnamaeian et al., 2015).

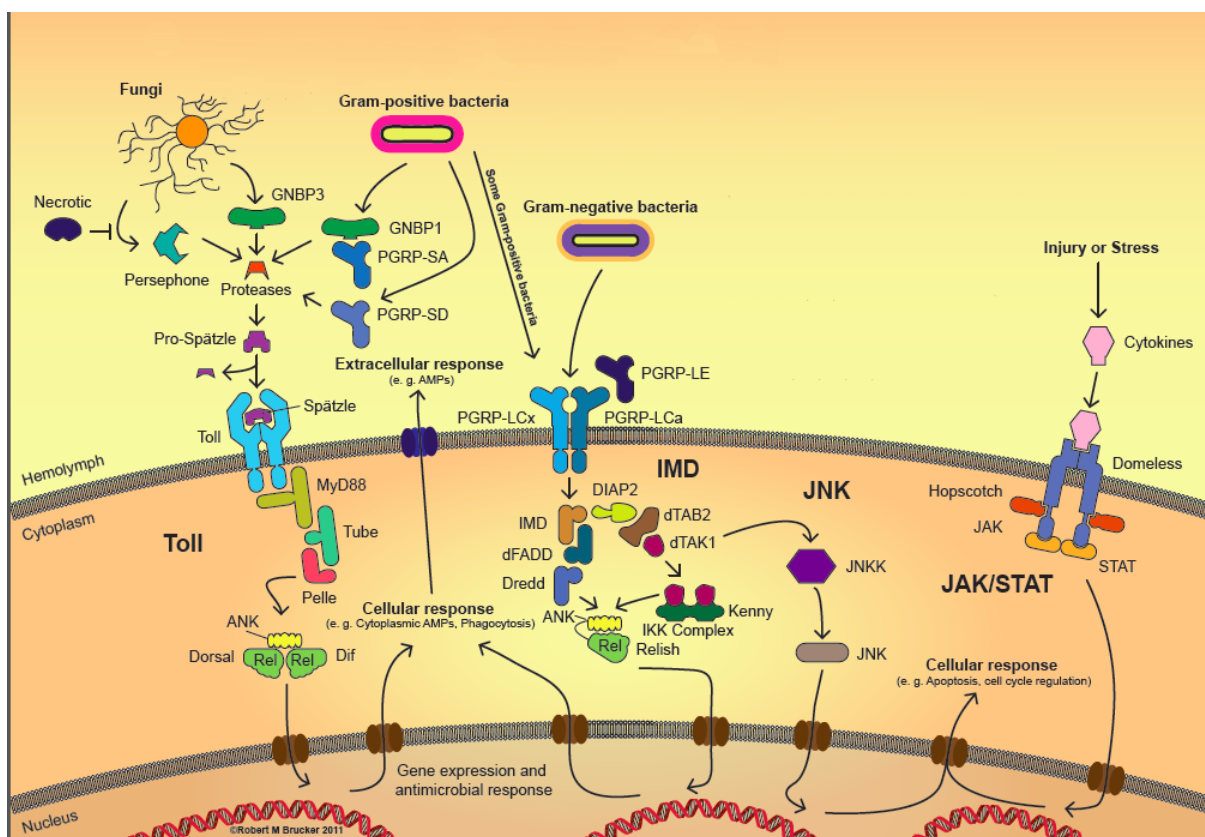


Figure 3 – Signalisation immunitaire via les voies Toll, IMD, JNK et JAK-STAT chez la drosophile.

Les voies Toll et IMD ont une capacité de reconnaissance préférentielle pour un ou plusieurs types de pathogènes, et déclenchent l'expression de nombreux gènes, codant notamment des PAMPs. La voie JAK-STAT est impliquée dans le contrôle de l'expression de protéines de stress et dans la régénération de l'épithélium intestinal. Voir détail de chaque voie de signalisation dans le texte. D'après Insecte Innate Immunity Database (IIID), copyright ©2011-2012 Robert Brucker.

#### LA VOIE TOLL

La voie Toll de la drosophile est activée par la reconnaissance de PGN de type « lysine », caractéristique de la paroi des bactéries à Gram-positif (Lemaitre et al., 1996, Lemaitre et al., 1997). Les MAMPs sont reconnus dans l'hémolymph par des Pattern Recognition Receptors (PRRs) incluant les Peptidoglycan Recognition Proteins (PGRP), PGRP-SD et PGRP-SA (Michel et al., 2001, Gottar et al., 2002), et les Gram-Negative Binding Proteins GNBP1 et GNBP3 (Gobert et al., 2003, Mishima et al., 2009) pour les bactéries à PGN de type « lysine » (Ligoxykakis et al., 2002). La liaison MAMP-PRR déclenche une cascade protéolytique aboutissant au clivage activateur de la cytokine Spätzle, qui va à son tour se lier au récepteur membranaire Toll et déclencher la transmission intracellulaire du signal (Lemaitre et al., 1996). Il existe neuf

isoformes de Toll chez la drosophile, la majorité reconnaissant spécifiquement Spätzle clivée, à l'exception de Toll-7 qui reconnaît des glycoprotéines virales et active l'autophagie antivirale, et non la voie Toll (Nakamoto et al., 2012), et de Toll-6 et -7 qui participent à la signalisation du développement neuronal (McIlroy et al., 2013). La cascade intracellulaire est composée de trois intermédiaires identifiés à ce jour : MyD88, Tube et Pelle (Lemaitre et al., 1996, Lemaitre et al., 1997, Horng and Medzhitov, 2001, Tauszig-Delamasure et al., 2002), et entraîne la phosphorylation du facteur inhibiteur de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) Cactus et sa dégradation par le protéasome (Nicolas et al., 1998). La dégradation de Cactus lève la séquestration cytosolique de Dif et Dorsal, deux facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, qui sont alors transloqués dans le noyau et activent l'expression des gènes codant des PAMs ciblant les bactéries à Gram-positif et/ou les champignons, comme la Drosomycine (Ip et al., 1993, Lemaitre et al., 1995).

#### LA VOIE IMD

La voie IMD de la drosophile, pour IMune Deficiency, a été identifiée grâce à une mutation sur le gène codant la protéine du même nom, qui causait une immunodéficiences sévère chez la drosophile (Lemaitre et al., 1995b, Corbo and Levine, 1996). La protéine IMD est activée par interaction avec des PGRP. PGRP-LC, membranaire, reconnaît dans l'hémolymph le peptidoglycane de type « acide diaminopimélique (DAP) » caractéristique des bactéries à Gram-négatif et des bactéries à Gram positif du genre *Bacillus*. PGRP-LE le reconnaît dans le cytoplasme (Choe et al., 2005, Kaneko et al., 2006). L'interaction de ces PGRP avec IMD déclenche une cascade intracellulaire de transduction du signal, impliquant l'intermédiaire FADD et la caspase DREDD (Leulier et al., 2000, Naitza et al., 2002). En parallèle, IMD interagit avec la protéine Inhibitor of Apoptosis 2 (IAP2), qui active la kinase TAK1 (Vidal et al., 2001, Silverman et al., 2003, Kleino et al., 2005, Leulier et al., 2006). TAK1 va activer à son tour le complexe IKK, capable de phosphoryler le facteur de transcription NF- $\kappa$ B Relish, présent dans le cytoplasme sous forme de pro-protéine (Silverman et al., 2000, Rutschmann et al., 2000). La phosphorylation de Relish permet le clivage de son domaine inhibiteur par DREDD, et la translocation de la protéine active dans le noyau où elle déclenche l'expression de PAMs ciblant les bactéries à Gram-négatif, comme la Diptéricine (Lemaitre et al., 1995b).



L'activation d'une réponse immunitaire est un processus très coûteux en énergie (Moret and Schmid-Hempel, 2000), et une activation durable peut générer des effets indésirables pour l'organisme hôte lui-même (Georgel et al., 2001, Paredes et al., 2011). Une réponse immunitaire efficace est donc une réponse d'intensité mesurée, faisant un compromis entre son coût pour l'organisme qui la déclenche et la lutte contre l'infection. Il est ainsi frappant de constater que la voie IMD est sujette à de très nombreux mécanismes de régulation, intervenant à différents niveaux de la cascade de signalisation : reconnaissance (au niveau des PGRP, c.f. ci-dessous), transmission du signal au niveau cytoplasmique (Ryu et al., 2008, Lhocine et al., 2008, Kleino et al., 2008), et transcription des gènes cibles (Goto et al., 2014). Cette abondance et diversité de mécanismes participe certainement à la robustesse de la régulation de la voie IMD, et souligne son importance.

La régulation de la voie IMD en amont des cascades de signalisation au niveau de la reconnaissance fait intervenir des protéines de la famille des PGRP. Chez la drosophile, quatre PGRP à activité amidasique capables de cliver le PGN ont été identifiées comme des régulateurs immunitaires : PGRP-LB, PGRP-SC1a, SC1b et SC2. Ces protéines, en dégradant le PGN extracellulaire en éléments non reconnus par les récepteurs immunitaires de la drosophile, réduisent la stimulation de la voie IMD (Zaidman-Remy et al., 2006, Bischoff et al., 2006, Paredes et al., 2011). PGRP-LF est un autre régulateur, mais ne présentant pas d'activité enzymatique. Il agit comme une forme dominante négative de PGRP-LC : PGRP-LF peut se dimériser avec PGRP-LC, mais son domaine intracellulaire ne permet pas d'activer la cascade de signalisation en aval, réduisant de ce fait la transmission du signal (Maillet et al., 2008).

#### REGULATION DE LA REPONSE HUMORALE PAR LES MICRO-ARN

Les micro-ARN (miARN) sont de petits ARN non codants, faisant de 20 à 23 nucléotides de long, dont la fonction est de réguler l'expression de gènes au niveau post-transcriptionnel. Ils se lient de façon spécifique à une région d'ARN messager (ARNm), généralement sur la région non traduite (UTR) en 3', et induisent leur dégradation, ou la répression de leur traduction (Bartel,

2009). Depuis la découverte des miARN chez le nématode *C. elegans* (Lee et al., 1993), ils ont été retrouvés chez les animaux, les plantes et les champignons (Bartel, 2009). Chez les insectes, ils jouent un rôle dans la régulation de divers processus physiologiques, incluant le développement, le métabolisme et l'immunité innée (Baker and Thummel, 2007, Asgari, 2011, Chawla and Sokol, 2011).

Fullaondo and Lee (2012) ont identifié 73 miARN ayant une fonction de régulation immunitaire chez la drosophile. Ils ont notamment mis en évidence la spécificité *in silico* de la séquence de plusieurs miARN avec des ARNm codant des gènes des voies Toll et IMD, incluant *pirk*, *fadd*, *tube* et les PGRP-SD, -LC et -LE. Les miARN pourraient donc être des régulateurs négatifs de l'expression des gènes codants pour les PGRP, pour lesquels aucun régulateur négatif génétique n'a pour le moment été identifié. Ces résultats sont appuyés par ceux obtenus chez le sphinx du tabac *Manduca sexta* par Zhang et al. (2014). Cette équipe a comparé les niveaux de miARN en conditions physiologiques et en condition d'infection bactérienne, et a remarqué une forte corrélation entre les variations d'expression des miARN et les niveaux d'expression de gènes de la réponse immunitaire. A titre d'exemple, le gène codant pour GGBP3, une PRR reconnaissant les parois fongiques, est exprimée fortement et spécifiquement dans le corps gras en conditions d'infection. L'expression de Mse-miR-10a, un miARN spécifique de la séquence de l'ARNm de *gnbp3*, est réprimée en conditions d'infection et dans le corps gras uniquement, suggérant un rôle de ce miARN dans la spécificité tissulaire de l'expression de *gnbp3*. Ce type de corrélation a été retrouvé pour d'autres gènes codant des PRRs, incluant des lectines et des leureptines (impliquées dans la reconnaissance des LPS des parois de bactéries à Gram-négatif). Le niveau d'expression de miARN spécifiques de douze gènes codant des PAMs est également diminué en cas d'infection, lorsque le niveau d'expression desdits gènes augmente drastiquement. Ces résultats suggèrent que les miARN seraient des acteurs importants de la régulation de l'immunité, ayant une influence sur l'ensemble des cascades de signalisation : PRRs, intermédiaires de signalisation, PAMs. Il manque cependant des données fonctionnelles pour tester leur rôle exact *in vivo* et quantifier leur impact par rapport à celui des régulateurs génétiques classiques.

## LA VOIE JNK

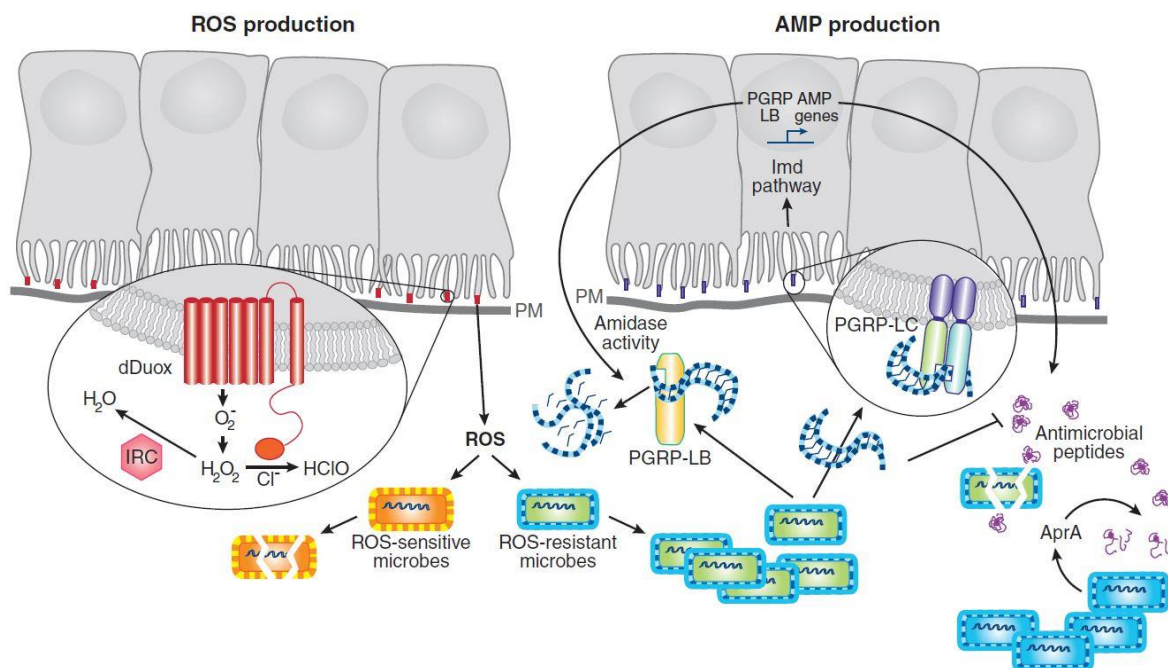
La voie c-Jun N-terminal kinase (JNK) est une voie de signalisation rattachée, chez la drosophile, à la voie IMD au niveau de TAK1. Lorsque TAK1 est activée par stimulation de la voie IMD, elle activerait à la fois le complexe IKK pour la signalisation NF- $\kappa$ B, et la JNK kinase Hemipterous, activant elle-même la JNK Basket par phosphorylation (Boutros et al., 2002). La voie JNK est impliquée dans la cicatrisation des blessures (Rämet et al., 2002a, Galko and Krasnow, 2004), et l'expression de gènes codant des PAMs dans le corps gras (Kallio et al., 2005, Delaney et al., 2006).

## LA VOIE JAK-STAT

La voie JAK-STAT est composée d'un récepteur, Domeless, d'une Janus Kinase (JAK) et du facteur de transcription Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) (Agaïsse et al., 2003). Son implication dans l'immunité a été proposée suite à l'observation que STAT s'accumulait dans le noyau en cas d'infection bactérienne (Barillas-Mury et al., 1999). Cette voie n'a pas d'influence sur l'expression des gènes codant des PAMs (Lemaitre and Hoffmann, 2007), mais commande l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress, comme le gène du complément *tep2* et la famille de gènes *turandot* (Lagueux et al., 2000, Boutros et al., 2002, Agaïsse et al., 2003). Elle stimule également la régénération de l'épithélium intestinal par différenciation de cellules souches en cas d'infection orale (Agaïsse and Perrimon, 2004, Buchon et al., 2009), et joue un rôle dans la réponse antivirale (Dostert et al., 2005).

### 2.3.1.2 L'immunité locale

Certains tissus de l'insecte sont fréquemment exposés à des bactéries exogènes, en particulier les épithélia intestinaux et sous-cuticulaires. Ces tissus sont capables de générer une réponse immunitaire caractéristique, appelée réponse locale, ou épithéliale (Brey et al., 1993, Ferrandon et al., 1998, Tzou et al., 2000). La réponse immunitaire locale implique deux mécanismes distincts : la production de Dérivés Réactifs de l'Oxygène (DRO), et la production de PAMs (Figure 4).



**Figure 4 – Réponse immunitaire locale de la drosophile.**

La réponse locale, ou épithéliale, implique la libération de DRO dans la lumière intestinale, et la production de PAMs. La production de DRO est assurée par Duox, et consiste en la synthèse d' $H_2O_2$  et de  $HOCl$ , deux composés bactéricides. L'excédent d' $H_2O_2$  est dismuté par la catalase immunoréactive CIR pour éviter un stress oxydatif trop intense pour les cellules épithéliales. La production de PAMs est constitutive dans certains tissus et NF- $\kappa$ B indépendante. Dans d'autres tissus, elle est déclenchée en réponse à une agression bactérienne, et fait intervenir la voie IMD. D'après Lemaitre et Hoffmann, 2007.

La production inductible de DRO dans l'épithélium intestinal implique Duox (Dual Oxydase), une protéine appartenant à une famille très conservée, possédant un domaine N-terminal extracellulaire à activité peroxidase (Ritsick et al., 2004). En cas d'infection bactérienne, Duox est activée et produit un burst d'ions superoxyde  $O_2^-$ , qui se dismutent spontanément en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  dans le milieu extracellulaire.  $H_2O_2$  est pris en charge par un domaine myéloperoxidase de Duox, catalysant sa réaction avec un ion chlorure pour produire de l'acide hypochloreux  $HOCl$ , un composé à forte activité bactéricide (Ha et al., 2005). Une catalase immunoréactive (CIR) prend en charge l'excédent d' $H_2O_2$  et le dismute en  $H_2O$  et  $O_2$ , limitant ainsi le stress oxydatif (Ha et al., 2005b) : le processus apparaît donc finement régulé.

La réponse immunitaire locale implique également la synthèse de PAMs, détectée dans l'épithélium sous-cuticulaire, l'épiderme, les appareils digestifs,

reproducteurs et respiratoires (Brey et al., 1993, Ferrandon et al., 1998, Tzou et al., 2000). La synthèse locale de PAMs dans ces tissus peut être constitutive ou inductible. Une production constitutive est par exemple retrouvée dans les glandes salivaires et le système reproducteur de la drosophile (Tzou et al., 2000). La production de ces PAMs n'est pas augmentée en cas d'infection, et l'expression des gènes codants n'est pas dépendante de voies de signalisation NF- $\kappa$ B, mais sous un mode de contrôle qui leur est propre, impliquant notamment le produit du gène homéotique *caudal* (Han et al., 2004, Ryu et al., 2008). La synthèse inductible de PAMs est observée en cas d'infection au niveau des épithélia. Elle implique uniquement la voie IMD, stimulée par la reconnaissance de PGN de type « DAP » et contrôlée négativement par les PGRPs à activité amidasique, tout comme la réponse humorale (Mellroth et al., 2003, Zaidman-Remy et al., 2006, Paredes et al., 2011). Une régulation supplémentaire est cependant active au niveau local, avec l'exemple de PIMS (aussi nommé Pirk ou Rudra), capable de se lier au PGRP-LC dans l'épithélium intestinal pour le dépléter de la membrane et limiter l'activation de la voie IMD (Lhocine et al., 2008, Kleino et al., 2008, Aggarwal et al., 2008). De tels mécanismes de régulation négative sont particulièrement importants dans l'épithélium intestinal, en contact avec une flore bactérienne mutualiste. Ils permettraient à l'insecte de moduler sa réponse locale de façon à lutter contre les pathogènes, tout en tolérant sa flore mutualiste.

### 2.3.1.3 *L'immunité cellulaire et la phagocytose*

Une partie de l'immunité innée de la drosophile est assurée par des cellules circulantes dans l'hémolymphe de l'insecte, les hémocytes. Ces cellules peuvent être classées en trois catégories fonctionnelles : les lamellocytes, les plasmatocytes, et les cellules à cristaux (Rizki, 1978, Lanot et al., 2001). Les lamellocytes sont responsables de l'encapsulation, un processus immunitaire typiquement impliqué dans la lutte contre les parasitoïdes et les corps étrangers trop gros pour être phagocytés (Rizki and Rizki, 1992, Meister, 2004, Williams, 2007). Les cellules à cristaux participent à la coagulation (Meister, 2004, Bidla et al., 2005) et à la mélanisation (Christensen et al., 2005), un mécanisme de défense propre aux invertébrés qui intervient dans l'obturation des blessures et participe à l'encapsulation. Les plasmatocytes, qui représentent 90 à 95% des

hémocytes de la drosophile (Lemaitre and Hoffmann, 2007), ont pour fonction de phagocyter les micro-organismes et les cellules apoptotiques. Le processus de phagocytose est activé par la reconnaissance de motifs moléculaire par des PRRs situés sur la membrane des plasmotocytes. Les PRRs phagocytaires les plus étudiés sont les récepteurs à motifs répétés de type EGF (Epidermal Growth Factor) (Manaka et al., 2004, Kocks et al., 2005, Kurucz et al., 2007, Bretscher et al., 2015), et les PRRs de type Scavenger Receptor (SR) (Franc et al., 1996, Agaisse et al., 2005, Philips et al., 2005). Un rôle dans la reconnaissance phagocytaire d'*E. coli* a également été mis en évidence pour PGRP-LC et PGRP-SC1 (Rämet et al., 2002b, Garver et al., 2006). L'internalisation de la particule reconnue et sa dégradation sont encore peu comprises chez les insectes. L'internalisation et la formation du phagosome ferait intervenir une multitude d'acteurs dont des gènes impliqués dans la réorganisation du cytosquelette (Rämet et al., 2002b, Agaisse et al., 2005, Philips et al., 2005, Stroschein-Stevenson et al., 2005). La dégradation du contenu du phagosome pourrait se faire de la même manière que chez les mammifères (Stuart and Ezekowitz, 2005, Stuart et al., 2007), impliquant la synthèse de DRO, de protéases et de PAMs (Selsted and Ouellette, 1995, Reeves et al., 2002). Les plasmotocytes ont aussi une fonction de sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire, et de PAMs (Fessler et al., 1994, Dimarcq et al., 1997).

## 2.3.2 Mécanismes de contrôle intégré de l'immunité

Un nombre croissant d'études montre que l'immunité, loin d'être un processus autonome, est pleinement intégrée à l'homéostasie générale de l'organisme. Les interactions les mieux explorées à l'heure actuelle sont celles qui lient le système endocrinien et l'immunité à travers deux hormones : l'insuline et l'ecdysone.

### 2.3.2.1 *Insuline et stockage énergétique*

Les mécanismes de stockage de l'énergie sous forme de polymères de carbohydrates (glycogène) ou de lipides (triglycérides) chez la drosophile sont similaires à ceux des mammifères. Chez les insectes, c'est le corps gras qui stocke les triglycérides et le glycogène, et régule leur synthèse et leur

catabolisme pour répondre à la demande énergétique de l'organisme (Baker and Thummel, 2007, Leopold and Perrimon, 2007). Le signal est transmis par des peptides insuline-like (PIL) ou glucagon-like (PGL) sécrétés par des cellules spécialisées du système nerveux central, qui se lient à des récepteurs insuline-like (RIL) au niveau de la membrane des adipocytes (Kim and Rulifson, 2004, Kannan and Fridell, 2013). La liaison PIL/RIL déclenche deux voies de signalisation intracellulaires médiées par Akt1, qui régule négativement le facteur de transcription Foxo, déclenchant la mise en réserve (Puig et al., 2003). Akt1 a aussi pour fonction de réguler positivement la voie Target Of Rapamycin (TOR), promouvant ainsi la croissance cellulaire et inhibant l'autophagie (Rajan and Perrimon, 2013). Le coût du déclenchement d'une réponse immunitaire (Moret and Schmid-Hempel, 2000) suggère la nécessité d'une redistribution des ressources métaboliques vers les tissus immuno-réactifs en cas d'infection. Les drosophiles infectées par *Mycobacterium marinum* perdent par exemple leurs réserves de triglycérides et de glycogène et deviennent hyperglycémiques. Les mutants *foxo* montrent un phénotype réduit, suggérant que l'infection cause une dérégulation du stockage énergétique en agissant sur la voie Akt1/Foxo (Dionne et al., 2006). Plus récemment, il a été montré que le facteur Foxo pouvait se lier directement à des sites NF- $\kappa$ B en amont de gènes de l'immunité, suggérant une connexion directe entre les voies Akt1/Foxo et la réponse immunitaire NF- $\kappa$ B-dépendante (Becker et al., 2010). Cette connexion est à double sens : l'activation de la voie Toll lors d'une infection réduit l'activité de la voie Akt1/Foxo, causant une perte de réserves métaboliques et une réduction de croissance (DiAngelo et al., 2009).

#### 2.3.2.2 *Régulations par l'ecdysone*

L'ecdysone est une hormone stéroïdienne impliquée dans la métamorphose et le remodelage des tissus tout au long du développement des insectes (Thummel, 2001, Di Cara and King-Jones, 2013). C'est une des hormones les plus largement impliquées dans le développement du système immunitaire chez la drosophile. Les embryons ne sont pas capables de répondre à une infection, jusqu'à la toute fin du développement embryonnaire où une libération courte mais intense d'ecdysone permet d'amorcer le développement du système immunitaire (Tan et al., 2014). Le développement complet de l'immunité, incluant la pleine expression des gènes codant les PAMs dans le corps gras,

s'achève à la fin du dernier stade larvaire, suite à une nouvelle libération intense d'ecdysone signalant le début de la pupation (Reichhart et al., 1992, Meister and Richards, 1996, Rus et al., 2013). L'immunité cellulaire est également dépendante de l'ecdysone (Dimarcq et al., 1997, Lanot et al., 2001). Des hémocytes soumis à l'ecdysone voient augmenter leur mobilité, la plasticité de leur cytosquelette et leurs capacités de phagocytose. En l'absence d'ecdysone, les hémocytes deviennent inefficaces, et les drosophiles très sensibles aux infections malgré la fonctionnalité de la réponse humorale (Regan et al., 2013).

### 2.3.3 L'apoptose et l'autophagie

La forte intégration de l'immunité à l'homéostasie générale de l'organisme rend difficile la délimitation d'une frontière nette entre immunité et autres processus cellulaires. Deux processus en particulier, l'apoptose et l'autophagie, sont de plus en plus fréquemment considérés comme des mécanismes immunitaires à part entière (Virgin and Levine, 2009, Levine et al., 2011, Rubinsztein et al., 2012, Daigneault et al., 2012, Aguiló et al., 2014). Leur implication dans la régulation de la dynamique des endosymbiotes a récemment été mise en évidence chez le charançon *Sitophilus* (Vigneron et al., 2014).

#### 2.3.3.1 L'apoptose

Les eucaryotes pluricellulaires subissent au cours de leur développement de multiples réarrangements tissulaires, et un renouvellement cellulaire permanent tout au long de leur vie. Tous ces organismes ont en commun un mécanisme très conservé, l'apoptose, qui participe à leur homéostasie en éliminant de façon contrôlée les cellules obsolètes ou endommagées (Vaux and Strasser, 1996, Kaufmann and Hengartner, 2001). Son implication dans l'immunité passe principalement par l'élimination de cellules du soi qui prolifèrent de façon incontrôlée, de cellules à l'ADN endommagé, ou de cellules infectées par des pathogènes intracellulaires.

L'apoptose peut être déclenchée par deux voies de signalisation : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La voie extrinsèque est activée par la liaison de ligands extracellulaires à des récepteurs membranaires de la famille des Tumor Necrosis Factor R (TNF-R) (Locksley et al., 2001). Les récepteurs TNF-R disposent d'un domaine intracellulaire appelé « death domain », qui va



transmettre le signal extracellulaire à une cascade de signalisation intracellulaire (Ashkenazi and Dixit, 1998). L'activation de la voie extrinsèque déclenche le clivage activateur d'une caspase initiateur, la caspase 8 (Elmore, 2007). La voie intrinsèque est déclenchée par des stimuli intracellulaires affectant les mitochondries. Ces stimuli peuvent être passifs ou actifs (Elmore, 2007). Les signaux passifs correspondent à une absence d'hormones ou de facteurs de croissance, signifiant la levée d'une inhibition de l'apoptose pour la cellule. Les signaux actifs sont dus à un stress de nature chimique (hypoxie, radiations) ou infectieux. Ces stimuli causent une dépolarisation de la membrane interne des mitochondries et la formation de pores dans la membrane externe, libérant des protéines pro-apoptotiques normalement séquestrées dans l'espace intermembranaire (Saelens et al., 2004). Ces protéines pro-apoptotiques déclenchent le clivage activateur de la caspase initiateur 9 (Elmore, 2007).

Les caspases initiateurs 8 et 9 activent toutes les deux le même processus intracellulaire en activant des caspases effectrices, responsables de la mort cellulaire. La plus importante d'entre elles est la caspase 3 chez les mammifères, dont le rôle est assumé par Drice, Decay et Drp-1 chez la drosophile. La caspase 3 active une DNase, responsable de la dégradation de l'ADN de la cellule apoptotique (Sakahira et al., 1998). En parallèle, elle active la gelsoline, une protéine cytoplasmique qui va disloquer les filaments d'actine (Kothakota et al., 1997). La cellule, dont l'ADN est clivé et le cytosquelette désorganisé, va alors se fragmenter en vésicules appelées corps apoptotiques, dont l'élimination sera assurée par phagocytose. L'apoptose permet d'éviter le déversement du contenu de la cellule dans le milieu extracellulaire, et donc son élimination sans phénomène inflammatoire (Kerr et al., 1972, Hengartner, 2000, Elmore, 2007).

L'inhibition de l'apoptose fait partie des stratégies évolutives de certains pathogènes intracellulaires pour persister chez leur hôte, tels que les pathogènes humains *Neisseria gonorrhoeae* et *Chlamydia trachomatis* (Rajalingam et al., 2006, Howie et al., 2008, Rudel et al., 2010). Dans le système *S. oryzae/S. pierantonius*, les tissus larvaires hébergeant les endosymbiotes montrent une forte expression des gènes anti-apoptotiques *iap2* et *iap3*, ainsi qu'une expression très faible d'un gène codant pour une caspase non identifiée (Vigneron et al., 2012), suggérant que la manipulation de l'apoptose pourrait faire partie du processus d'endosymbiogenèse.

### 2.3.3.2 *L'autophagie*

L'autophagie est un processus cellulaire par lequel une cellule fait intervenir ses lysosomes pour dégrader certains de ses composants internes et de les recycler en partie. Elle est considérée comme un mécanisme évolutif apparu avec les eucaryotes unicellulaires, leur permettant d'une part d'assurer un turn-over régulier de leurs organites, et d'autre part de survivre dans des conditions de privation nutritionnelle en recyclant les organites non indispensables au profit de ceux qui le sont (Levine et al., 2011). Chez les eucaryotes pluricellulaires, ce mécanisme permettrait à l'organisme une réaffectation de ses ressources cellulaires en conditions de privation nutritionnelle (Yorimitsu and Klionsky, 2005).

L'autophagie fait intervenir une multitude de gènes, appelés par consensus ATG (AuTophagy-related Gene, parfois nommés APG pour AutoPhagy-related Gene) suivi d'un numéro (Klionsky et al., 2003). En conditions homéostatiques, l'autophagie est réprimée par la voie TOR, notamment par la sérine/thréonine kinase TOR qui régule négativement ATG1 (Kamada et al., 2000, Chang and Neufeld, 2009). L'inhibition de la voie TOR, dont le principal facteur est un jeûne de l'organisme, active ATG1, qui se lie à ATG13 et ATG17. Le complexe ainsi formé recrute d'autres protéines ATG et mène à la formation d'un phagophore. Le phagophore est une amorce de double-membrane, qui croît grâce au recrutement de nouvelles protéines de la famille ATG (Kabeya et al., 2005, Suzuki et al., 2007, Cheong et al., 2008, Kawamata et al., 2008, He and Klionsky, 2009). Le phagophore en maturation, ou autophagosome, enveloppe progressivement le contenu cytoplasmique à recycler jusqu'à former une vacuole l'isolant complètement du reste du cytoplasme. L'origine de la membrane constituant l'autophagosome est discutée, certains auteurs proposant comme origine les mitochondries, l'appareil de Golgi ou encore le réticulum endoplasmique (Reggiori et al., 2005, Juhasz and Neufeld, 2006). Une fois l'autophagosome mature, les protéines ATG s'en détachent, et les protéines LAMP-2 et Rab7 médient sa fusion avec des lysosomes (Tanaka et al., 2000, Jager et al., 2004). Les lysosomes apportent des protéinases et des lipases qui dégradent le contenu cellulaire emprisonné dans l'autophagosome mature (Epple et al., 2001, Teter et al., 2001, Tanida et al., 2005). La façon dont les composants cellulaires dégradés sont ensuite recyclés est encore méconnue. Le modèle ayant permis la plus fine description de ce processus à ce jour est la

levure, chez qui la dégradation autophagosomale produit des acides aminés libres qui sont exportés vers le cytoplasme grâce à la perméase ATG22 et sont réutilisés pour des synthèses de protéines *de novo* (Yang et al., 2006).

L'autophagie est intimement liée à l'immunité dans le cas d'infections intracellulaires. Chez la drosophile, la défense contre *Listeria monocytogenes*, une bactérie pathogène intracellulaire stricte, passe par la reconnaissance de son PGN par le PGRP-LE, qui active l'autophagie et permet ainsi l'élimination des bactéries intracellulaires (Yano et al., 2008). L'autophagie a aussi été identifiée comme un acteur central de l'élimination des populations symbiotiques chez d'autres modèles. Chez l'anémone de mer *Aiptasia pallida*, l'autophagie participe à l'élimination de symbiotes dinoflagellés lors du phénomène de blanchissement, une réaction de l'hôte face à un stress environnemental, dont la fonction est encore mal comprise (Dunn et al., 2004, Dunn et al., 2007). Elle est également impliquée dans des éliminations physiologiques, indépendantes de tout stress, comme le recyclage de l'endosymbiote *S. pierantonius* à l'achèvement de la synthèse cuticulaire du charançon *S. oryzae* (Vigneron et al. (2014), voir 1.3.3.2 *Implication de la symbiose dans la synthèse de la cuticule de l'hôte*). Enfin, il a été montré que la transfection d'une souche de l'endosymbiote *Wolbachia* de son hôte naturel *Armadillidium vulgare* à un nouvel hôte phylogénétiquement très proche, *Porcellio dilatatus*, cause chez ce dernier un déclenchement massif de l'autophagie le menant à sa mort (Le Clec'h et al., 2012). Ce résultat suggère que chez l'hôte original, le maintien de *Wolbachia* passe par une tolérance immunitaire, sélectionnée au cours de l'évolution du système symbiotique, et impliquant un faible niveau d'autophagie chez l'hôte (Le Clec'h et al., 2012).

#### 2.3.4 Conservation et plasticité du système immunitaire

De nombreux gènes de l'immunité sont très conservés dans le monde vivant. Un exemple particulièrement marquant de conservation est celui du gène *toll*, dont la séquence présente un fort taux de similarité avec celle du récepteur à l'interleukine 1 chez les mammifères, ainsi que des domaines fonctionnels conservés (Gay and Keith, 1991). La découverte chez les mammifères de plusieurs gènes homologues au gène *toll* de la drosophile a mené à la création de la famille des TLR (Toll-Like Receptors), qui compte aujourd'hui 10 gènes

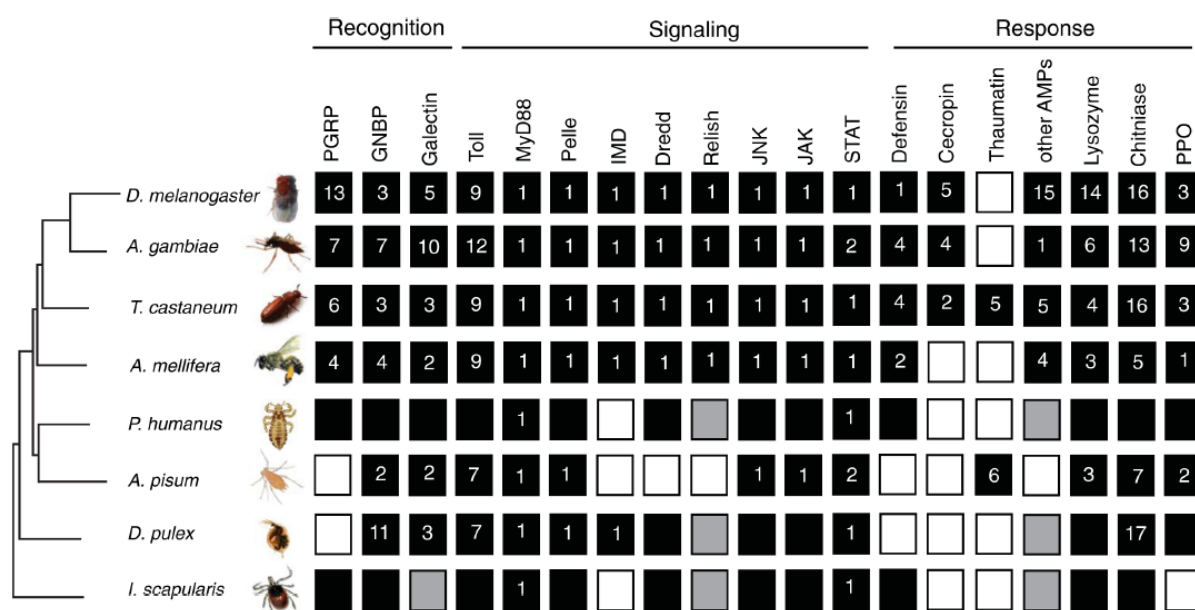


Figure 5 – Conservation génétique des principales fonctions immunitaires des arthropodes.

Un carré noir indique la présence du gène dans le génome de l'espèce considérée, avec le nombre de copies détectées lorsqu'il est connu. Un carré blanc indique l'absence du gène, un carré gris une incertitude. D'après Gerardo et al. (2010).

identifiés chez l'homme, et 13 chez la souris, avec un rôle démontré comme prépondérant à la fois dans l'immunité innée et dans l'activation et l'orientation de la réponse adaptative (Medzhitov et al., 1997, Takeuchi et al., 1999, Rui et al., 2003, Takeda and Akira, 2005, Moresco et al., 2011). Le gène *toll* a pour le moment été trouvé chez tous les insectes dont le génome a été séquencé, à un nombre variable de copies, entre 7 chez le puceron *A. pisum* et 12 chez le moustique *A. gambiae* (Gerardo et al., 2010). D'autres gènes de la voie Toll présentent une forte conservation, comme *myd88* ou *pelle*, tous deux retrouvés en une seule copie chez de nombreux insectes, ainsi que les principaux acteurs des voies JNK et JAK-STAT (Gerardo et al., 2010). D'une façon générale, les intermédiaires de signalisation sont retrouvés dans le génome des espèces d'insectes récemment séquencées, suggérant que le modèle Toll/IMD de la Drosophile est plutôt conservé. Il existe cependant des variations dans la présence ou dans l'absence de gènes effecteurs (PAMs, lysozyme) ainsi que dans le nombre de copies de ces derniers (Gerardo et al., 2010). Un des exemples les plus frappants de plasticité immunitaire est le puceron *A. pisum*. Chez cette espèce, plusieurs intermédiaires indispensables au fonctionnement de la voie IMD sont absents du génome, notamment *imd*, *fadd*, *dredd* et *relish*. Le génome ne contient pas non plus de gènes codant pour des PAMs connus,

ni de *pgrp*, alors que cette famille est généralement très conservée (Werner et al., 2000, Steiner, 2004, Gerardo et al., 2010). L'observation que des symbiotes facultatifs d'*A. pisum* lui confèrent une protection contre certains parasitoïdes et champignons (Scarborough et al., 2005, Oliver et al., 2005) a amené certains auteurs à spéculer que les gènes du système immunitaire d'*A. pisum* auraient été perdus au cours de son évolution symbiotique, au fur et à mesure que les fonctions de défense auraient été reportées sur les symbiotes (Altincicek et al., 2008, Gerardo et al., 2010). Cette hypothèse soulève la question des capacités défensives des pucerons dépourvus de symbiotes facultatifs « défensifs », puisque ces derniers sont viables dans l'environnement. Une réponse partielle a été apportée de façon indirecte par l'étude de Costechareyre et al. (2013), focalisée sur les changements transcriptomiques de la bactérie *Dickeya dadantii* lorsqu'elle est injectée à *A. pisum*. L'injection de la bactérie dans l'insecte déclenche chez la bactérie l'induction de gènes **impliqués** dans ses mécanismes de défense contre les PAMs, suggérant que l'hémolymph puceron montre une activité « PAM-like » en cas d'infection. Cette dernière pourrait être générée par ses symbiotes facultatifs, mais aussi potentiellement par des protéines codées par son génome et dont la fonction aurait évolué vers la défense contre les infections à partir d'une fonction ancestrale non immunitaire. Cette dernière hypothèse expliquerait que ces « nouveaux » PAMs n'aient pas été détectés à l'analyse du génome, faute d'identité de séquence suffisante avec les PAMs déjà décrits. Cet exemple suggère que, bien que les fonctions immunitaires principales soient généralement conservées d'une espèce à l'autre, leurs mécanismes exécuteurs sont sujets à une forte plasticité et invitent à la prudence quant aux comparaisons de l'immunité d'autres espèces au modèle *Drosophila*, qui bénéficie de la description la plus détaillée à ce jour, mais n'est pas universel.

### 2.3.5 Immunité innée et contrôle des endosymbiotes chez *S.oryzae*

Un des traits évolutifs majeurs des insectes à symbiose obligatoire est la différenciation de cellules spécialisées dans l'hébergement des endosymbiotes, les bactériocytes, qui sont regroupés chez certaines espèces en bactériomes. Une forte expression de plusieurs gènes de la réponse immunitaire a été observée dans le bactériome larvaire de *S. oryzae* (Heddi et al., 2005, Anselme et al., 2006, Anselme et al., 2008, Login et al., 2011, Vigneron et al., 2012). Parmi ces dernier, un gène codant pour un PAM, la Coléoptéricine A, est exprimé en conditions physiologiques, et cible les endosymbiotes dans tous les bactériomes (larvaire, ovarien et intestinaux), ainsi que les autres tissus hébergeant l'endosymbiote (embryon, ovocytes, trophocytes) (Anselme et al., 2008). Login et al. (2011) ont montré que ColA a une activité bactériostatique dans le bactériome. Elle bloque la cytokinèse des endosymbiotes, les empêchant de réaliser des divisions complètes, sans toutefois altérer la réplication de leur ADN, causant une polyploïdie et un gigantisme bactériens. La concentration en ColA augmente en bordure du bactériome, et atteint des seuils bactéricides, ce qui assurent le confinement de *S. pierantonius* dans l'organe (Login et al., 2011). L'inhibition de l'expression du gène codant ColA aboutit à une infection des tissus de l'hôte par le symbiote, montrant l'importance de ce PAM comme effecteur du contrôle immunitaire de la symbiose. L'activité de ColA participe ainsi à la « domestication » de *S. pierantonius*. Elle empêche la dispersion des bactéries dans l'organisme de l'hôte mais leur laisse la possibilité de multiplier leurs génomes, ce qui assure la production en quantités suffisantes des métabolites qu'elles apportent à l'hôte.

Le gène *wpgp1* (*weevil peptidoglycan recognition protein 1*) est aussi surexprimé dans le bactériome par rapport aux autres tissus. Ce gène est l'orthologue du gène *pgrp-lb* de la drosophile (Anselme et al., 2006), codant une PGRP à activité amidasique qui clive le PGN des bactéries à Gram négatif et réduit ainsi l'activation de la voie IMD (Zaidman-Remy et al., 2006). Chez la mouche tsétsé, Wang et al. (2009) ont montré que l'inhibition *in vivo* du gène codant PGRP-LB cause le déclenchement d'une réponse immunitaire systémique chez l'hôte, suggérant que PGRP-LB aurait pour fonction de dégrader le PGN de son endosymbiote obligatoire *Wigglesworthia*, et assurer de ce fait sa tolérance immunitaire. wPGRP1 pourrait avoir conservé ce rôle

chez *Sitophilus*, sur lequel des travaux sont en cours pour caractériser plus précisément sa fonction. Parmi les gènes à haut niveau basal d'expression dans le bactériome se trouve également *tollip*, un inhibiteur de la voie des TLR chez les mammifères (Burns et al., 2000, Zhang and Ghosh, 2002, Didierlaurent et al., 2006). Outre sa fonction de régulateur immunitaire, la protéine serait impliquée dans le trafic vésiculaire (Kato et al., 2004, Zhu et al., 2012), l'autophagie (Lu and Psakhye, 2014), et même dans la facilitation de la pénétration intracellulaire de bactéries pathogènes (Visvikis et al., 2011). Chez les insectes, *tollip* a peu attiré l'attention des immunologistes du fait de son étonnante absence du génome de la drosophile, alors qu'il est généralement très conservé entre vertébrés et invertébrés et présent chez des espèces proches comme la mouche domestique *Musca domestica* (Tang et al., 2014) ou le phlébotome *Phlebotomus papatasi* (Abrudan et al., 2013). Son rôle n'est pour l'instant pas élucidé, mais sa position centrale entre trafic vésiculaire, autophagie et immunité chez les mammifères en fait un candidat privilégié pour le contrôle génétique de la symbiose. De nombreux autres gènes immunitaires surexprimés dans le bactériome ont été mis en évidence, incluant *imd*, l'intermédiaire *iap2* (également impliqué dans la répression de l'apoptose), *relish* ou encore l'immunophiline anti-apoptotique *fk506bp* (Vigneron et al., 2012), suggérant l'expression dans le bactériome d'un programme génétique adapté à la tolérance et au maintien de la symbiose.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'acquérir une vision globale sur les diverses fonctions de l'immunité du bactériome d'insectes, d'étudier les mécanismes qui régissent les interactions mutualistes, et de comprendre comment le système immunitaire d'insectes strictement dépendants de symbiotes a évolué pour tolérer et contrôler les populations endosymbiotiques. Je me suis focalisé sur deux états symbiotiques : le stade larvaire et le stade jeune adulte. Au stade larvaire, j'ai investigué les mécanismes permettant le maintien de la symbiose, en étudiant notamment la régulation transcriptionnelle d'un peptide antimicrobien, la Coléoptéricine A. J'ai également mis en évidence d'autres fonctions de l'immunité du bactériome en cas de perturbation de l'homéostasie de cet organe par une infection bactérienne systémique. Enfin, je me suis interrogé sur les changements de régulations immunitaires et cellulaires du bactériome lors du passage de l'insecte à la vie adulte et en parallèle à la dynamique contrastée des endosymbiotes.

# *CHAPITRE 1*

## *REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA REPONSE IMMUNITAIRE INTERNE DU BACTERIOME*



# 1. Introduction à l'étude

Les aspects physiologiques et évolutifs des endosymbioses obligatoires d'insectes ont fait l'objet de nombreuses investigations durant les dernières décennies. En revanche, peu de travaux ont été consacrés aux interactions moléculaires hôte-symbiote permettant leur établissement, leur maintien et leur évolution. Pour que de telles associations soit pérennes, un équilibre semble nécessaire entre la tolérance de la bactérie dans certains tissus, afin que l'hôte puisse bénéficier de la complémentation métabolique, et son contrôle en nombre et en localisation afin d'éviter une infection systémique délétère. Le système immunitaire de l'hôte est au cœur de cet équilibre. Comment ce dernier perçoit-il les symbiotes ? Pourquoi ne les élimine-t-il pas ? Comment les maintient-il exclusivement dans des tissus spécialisés ?

Le contrôle de l'endosymbiose obligatoire passe par une stratégie évolutive de confinement des bactéries dans le cytoplasme des bactériocytes, des cellules exclusivement dédiées à cet effet. Chez la larve de *S. oryzae*, les bactériocytes sont regroupées à la jonction de l'intestin antérieur et de l'intestin moyen sous la forme d'un organe appelé le bactériome (Buchner, 1965). La larve présente une symbiose relativement 'stable' : la quantité de symbiotes varie relativement peu au cours de son développement pré-nymphal, et le bactériome larvaire ne change ni de forme, ni de localisation. Cette 'stabilité' fait de la larve de charançon un modèle de choix pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la symbiose à un état d'équilibre.

Le bactériome larvaire de *S. oryzae* exprime un programme génétique qui lui est propre (Anselme et al., 2008, Vigneron et al., 2012). Plusieurs gènes de la réponse immunitaire sont surexprimés dans ce tissu par rapport au reste de l'organisme. Parmi les gènes les plus fortement exprimés dans le bactériome se trouve le gène de la *coleoptericine A (colA)*, codant pour le peptide anti-microbien (PAM) du même nom. La ColA inhibe la cytokinèse des endosymbiotes et favorise leur confinement dans les bactériocytes (Login et al., 2011, Login and Heddi, 2013). L'injection de l'endosymbiote *S. pierantonius* dans l'hémolymph de l'hôte induit l'expression de plusieurs gènes codant pour les PAMs, y compris *colA*, montrant que les symbiotes peuvent être reconnus comme une bactérie 'exogène' infectieuse lorsqu'ils sont hors du bactériome

(Anselme et al., 2008). Dans cet organe pourtant, les gènes codant les PAMs sont, à l'exception de *colA*, peu ou pas exprimés (Anselme et al., 2008). La dichotomie entre l'expression de *colA* et celle des autres gènes codant des PAMs suggère une régulation transcriptionnelle fine de l'immunité dans le bactériome, dont la compréhension passerait, en partie, par l'étude et la caractérisation des gènes surexprimés.

L'objectif de ce premier chapitre est d'affiner la compréhension des mécanismes de régulation immunitaire dans le bactériome larvaire. Pour cela, j'ai utilisé une approche d'interférence à l'ARN (iARN), déjà mise au point et fonctionnelle chez le genre *Sitophilus* (Vallier et al., 2009). Dans une première partie, j'ai adapté le protocole d'iARN de façon à limiter ses effets secondaires chez la larve de *S. oryzae*. J'ai ensuite utilisé cette technique pour éteindre l'expression de gènes candidats, choisis pour leur forte expression basale dans le bactériome et leur appartenance présumée aux voies de signalisations immunitaires. Une fois l'expression du gène cible éteinte, un phénotype est recherché au niveau transcriptionnel : i- soit une diminution du niveau d'expression de *colA*, suggérant une implication du gène ciblé dans la régulation positive de son expression. ii- soit une induction de l'expression d'autres gènes codant des PAMs, suggérant une implication du gène ciblé dans la répression de ces derniers.

Une partie des résultats de ce chapitre sera publiée dans une revue sous invitation dans *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B*.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Élevage des charançons

Les charançons *S. oryzae* (souche Bouriz) sont élevés sur grains de blés à 27.5°C et à 70% d'humidité relative. La souche aposymbiotique a été obtenue comme décrit par Nardon et al. (1973). Elle est élevée dans les mêmes conditions que la souche symbiotique. Afin d'obtenir des cohortes d'individus synchrones, les charançons sont mis à pondre sur de nouveaux grains tous les trois à quatre jours. Les larves du troisième stade de développement (L3) sont

utilisées pour cette étude. Elles sont récoltées par dissection des grains de blés environ deux semaines après la ponte.

## **2.2 Synthèse et injection des ARN double-brin**

L'ARN double brin (ARNdb) a été synthétisé selon la méthode décrite par Vallier et al. (2009) en suivant les recommandations du kit MEGAscript RNAi Kit (Ambion, Austin, TX). Des produits de PCR de 200 pb  $\pm$  10 pb ont été utilisés comme matrice après purification en suivant les recommandations du kit NucleoSpin Extract II kit (MachereyNagel). Les amorces utilisées pour chaque gène cible sont répertoriées en table S1. A l'issue de l'étape de synthèse, les ARNdb sont précipités une nuit à -80°C en présence de 0,3 M d'acétate de sodium, 1,5  $\mu$ L de glycogène et deux volumes d'éthanol absolu. Avant injection, les ARNdb sont culottés par centrifugation 30 minutes à 12 000 g et repris dans le volume d'eau ultrapure nécessaire pour obtenir les concentrations de 2,89  $\mu$ g/ $\mu$ L, 1,45  $\mu$ g/ $\mu$ L ou 0,73  $\mu$ g/ $\mu$ L, correspondant respectivement à une quantité à injecter de 200 ng, 100 ng ou 50 ng dans un volume d'injection de 69 nl, ou de 2,71  $\mu$ g/ $\mu$ L pour une injection de 50 ng dans un volume de 18,4  $\mu$ L. Les injections sont réalisées à l'aide du Nanoject II (Drummond Scientific) dans la partie dorsale postérieure des larves en évitant toute lésion des organes internes. Les larves sont laissées en incubation entre deux couches de farine à 27.5°C et 70% d'humidité relative pendant six jours avant d'être disséquées. Les bactériomes et les carcasses de chaque larve sont congelés séparément à -80°C à raison de cinq lots de quatre larves par condition expérimentale.

## **2.3 Extractions d'ARN et transcription inverse**

Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit RNAqueous®-Micro (Ambion) en suivant les instructions du fournisseur. La concentration des ARN est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop® (Thermo Scientific) et leur qualité est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose. La transcription inverse est réalisée à l'aide du kit First Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen) en suivant les instructions du fournisseur.

## 2.4 Quantification des transcrits par RT-qPCR

La quantification des transcrits est réalisée sur le LightCycler 480® à l'aide du kit LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). Les réactions sont réalisées dans un volume de 10 µL comprenant 5 µL de SYBR Green Master Mix, 0,5 µL de chaque amorce à une concentration stock de 10 mM, 2,5 µL d'échantillon d'ADNc dilué au tiers et 1,5 µL d'eau ultrapure. Le programme d'amplification consiste en 5 minutes à 95°C, puis 45 cycles de 10 secondes à 95°C, 20 secondes à 56°C et 30 secondes à 72°C. L'identification des produits d'amplification est faite par la réalisation d'une courbe de fusion à la fin de chaque PCR, en chauffant à 66°C pendant 30 secondes puis en augmentant la température jusqu'à 95°C par incréments de 0,11°C/seconde. Les réactions ont été achevées par un refroidissement à 40°C pendant 30 secondes. Pour chaque échantillon, la quantification absolue des transcrits a été réalisée en comparant le point de franchissement (crossing point, le nombre de cycles à partir duquel une amplification est détectable dans l'échantillon) à une gamme étalon de concentrations d'ADNc connues. Les données de chaque échantillon sont normalisées par la concentration en cDNA de deux gènes de ménage, codant pour la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (*gapdh*) et la protéine ribosomale L29 (*rpL29*). Une liste complète des amorces utilisées est disponible en table S1.

## 2.5 Extraction d'ADN et quantification de *S. pierantonius*

L'ADN de larves entières a été extrait de lots de cinq larves broyées au potter dans un tube Eppendorf à l'aide du kit NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel). La quantification de l'ADN bactérien est réalisée grâce au kit LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I kit sur un LightCycler 480® (Roche Diagnostics). La cible est un fragment de 200 pb de la sous-unité CD du gène *NADH-ubiquinone oxidoreductase* (*NuoCD*; 5'-CACAGCCAAATGTGGTGAAG-3' et 5'-GCAGGTCATAGAGCATCACA-3'). Les qPCR sont réalisées dans un volume final de 10 µL comprenant 1 µL d'ADN purifié, 0,5 µL de chaque amorce à 10 mM, 5 µL de SYBR Green Master Mix et 3 µL d'eau ultrapure. Après 10 minutes à 95°C, les échantillons subissent 45 cycles de 10 secondes à 95°C, 10 secondes à 58°C et 10 secondes à 72°C. L'identification des produits d'amplification est faite par la réalisation d'une courbe de fusion à la fin de chaque PCR, en chauffant à 66°C pendant 30

secondes puis en augmentant la température jusqu'à 95°C par incréments de 0,11°C/seconde. Les réactions sont achevées par un refroidissement à 40°C pendant 30 secondes. Pour chaque échantillon, la quantification absolue du gène *nuoCD* est réalisée en comparant le point de franchissement à une gamme étalon de nombres de copies connus. Les données de chaque échantillon ont été normalisées par une quantification d'un gène de l'hôte codant pour la  $\beta$ -actine (5-GCCTCAACCTCCCTAGAAAA-3 et 5- GGTGTTGGCGTACAAGTCCT-3).

## **2.6 Imagerie par Hybridation In Situ en Fluorescence (FISH)**

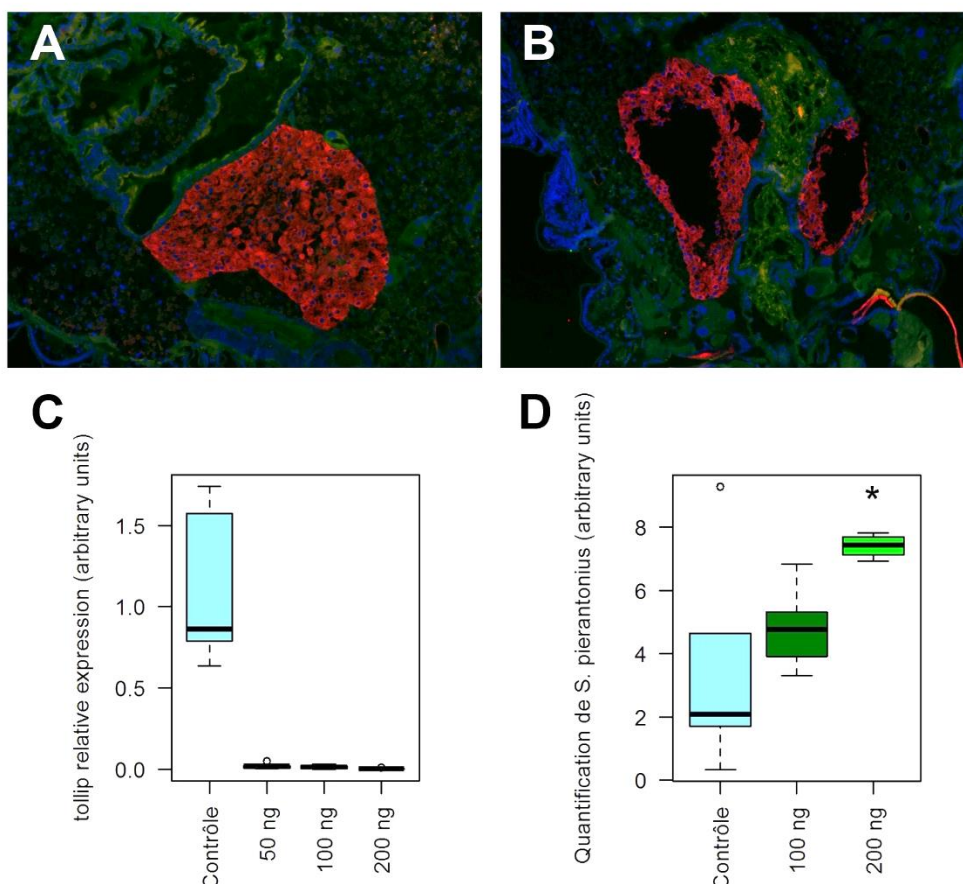
Entre quatre et six larves pour chaque condition expérimentale sont fixées entières par un bain de 48h dans du PFA 4 % avec triton X-100 0,1% juste après l'incubation. Les larves sont incluses en blocs de paraffine et coupées à l'aide d'un microtome HM340E à 3  $\mu$ m. Les coupes sont récupérées sur des lames Polysine® et séchées 24h à 37°C. Elles sont conservées à 4°C, à l'abri de la poussière et de la lumière. Après déparaffinage au méthylcyclohexane et une réhydratation, les coupes sont couvertes d'une goutte d'acide acétique à 70% à 60°C pendant 20 secondes pour les perméabiliser. Elles sont ensuite déprotéinisées par un bain d'HCl 0,01 N ; 0,5mL de pepsine 10 mg/mL à 37°C pendant 10 minutes. Les coupes subissent ensuite une hybridation par une sonde spécifique de l'ARN 16S de *S. periantonius* marquée en 5' par du TAMRA. Elles sont enfin lavées au PBS et montées dans du milieu PermaFluor™ Aqueous Mounting Medium (ThermoScientific) contenant 3  $\mu$ g/ml de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), comme décrit par Balmand et al. (2013). L'acquisition des images est faite sur un microscope à épifluorescence Olympus IX81 équipé de filtres HQ535/50 (vert), D470/40 (bleu) et HQ610/75 (rouge) et d'une caméra F-View II. Les images sont analysées à l'aide du logiciel ImageJ (version 1.49m).

## 3. Résultats

### 3.1 Mise au point des conditions d'injection des ARNdb

L'iARN a été utilisée plusieurs fois avec succès chez *Sitophilus* sans aucun effet secondaire notable pour l'insecte (Vallier et al., 2009, Login et al., 2011). L'utilisation systématique de cette technique a toutefois mis en évidence l'apparition d'effets secondaires lorsque certains gènes étaient ciblés, notamment des perturbations de la structure du bactériome visibles lors d'analyses par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) (Figure 1A et 1B). Le centre de l'organe apparaît dégradé, sans que les autres tissus ne montrent d'anomalies structurales. Ce phénotype est rare, observé dans seulement 0 à 25% des échantillons en fonction de l'ARNdb utilisé, y compris lors de l'injection d'ARNdb ne ciblant aucun gène de *S. oryzae*, et semble survenir de façon aléatoire. Ces données suggèrent qu'il est directement causé par l'injection de l'ARNdb sur des larves particulièrement sensibles, et non pas l'extinction de l'expression du gène cible. Il est cependant suffisant pour introduire un biais potentiel dans les analyses dans la mesure où les larves au bactériome détérioré ne peuvent pas être identifiées sans étude histologique, et risquent ainsi d'être utilisées dans l'échantillonnage pour les expériences de RT-qPCR.

Afin de limiter au maximum l'apparition de ces effets secondaires, une mise au point sur les conditions d'injection des ARNdb a été réalisée avant d'appliquer la technique aux gènes d'intérêt. Un ARNdb ciblant le gène *tollip* (ARNdb - *tollip*), très fortement exprimé dans le bactériome larvaire, a été injecté à des larves à raison de 200 ng, la quantité classiquement injectée dans les études publiées, et à raison de 100 ng et 50 ng, afin d'identifier la quantité minimale suffisante pour éteindre son expression. La quantification des transcrits *tollip* six jours après l'injection des différentes doses montre que l'expression du gène est éteinte quelle que soit la quantité d'ARNdb injectée (Figure 1C). Afin de vérifier que l'injection d'ARNdb n'a pas d'effet propre sur le nombre de symbiotes, ces derniers ont été quantifiés après injection de 100 ng et 200 ng d'ARNdb-*gfp*, ne ciblant aucune portion du génome de *S. oryzae*. L'injection de 200 ng cause une augmentation significative du nombre de symbiotes chez la larve (t-test de Welch, p-value = 0,0087), confirmant que de fortes doses d'ARNdb peuvent perturber l'homéostasie symbiotique (Figure 1D).



**Figure 1 – Optimisation des conditions d'injection d'ARNdb chez la larve de *S. oryzae*.**

(A) et (B), observation de bactériomes (en rouge) après injection dans la larve de 200 ng d'ARNdb-gfp, ne ciblant aucun gène de *S. oryzae*. (A) Exemple de larve non altérée, le bactériome apparaît compact et relativement homogène. (B) Exemple de larve au phénotype de bactériome au cœur dégradé. Les bords de l'organe sont préservés et les autres tissus (en vert) ne semblent pas affectés. (C) Quantification des transcrits du gène *tollip* dans le bactériome après injection de 50, 100 ou 200 ng d'ARNdb-*tollip* par rapport au contrôle non traité. (D) Quantification relative des endosymbiotes après injection de 100 ng ou de 200 ng d'ARNdb-*gfp* par rapport à un contrôle non traité.

L'injection de 100 ng ne cause pas d'augmentation significative du nombre de symbiotes (t-test de Welch, p-value = 0.0554), mais semble néanmoins causer une tendance à l'augmentation (Figure 1D). La quantité à injecter retenue pour la suite de ce travail a donc été 50 ng, concentration efficace la plus basse, sous le seuil entraînant des effets secondaires indésirables en six jours. Des expériences supplémentaires de FISH ont été réalisées après injection de 50 ng d'ARNdb-*gfp* afin de confirmer l'absence d'effets secondaires de ce protocole, et n'ont révélé aucun bactériome dégradé. Ces résultats confirment que 50 ng est une quantité adéquate chez la larve de *S. oryzae* pour éteindre au moins l'expression de *tollip* sans causer d'effets délétères indépendants du gène cible.

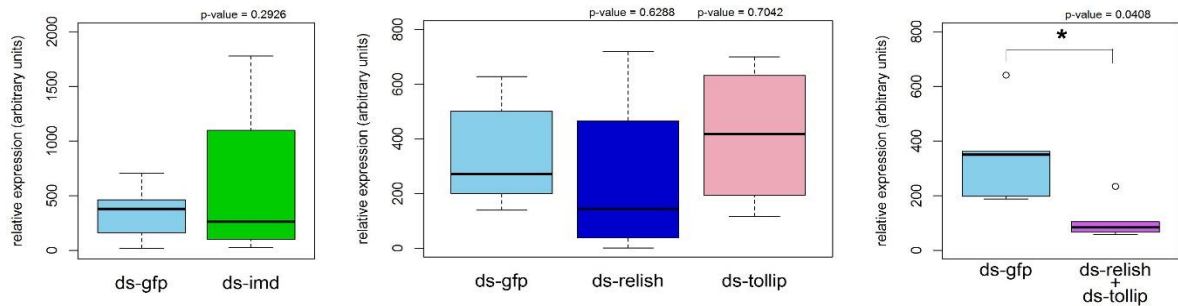
Afin de limiter le choc osmotique lié à l'injection d'une quantité d'ARNdb quatre fois plus faible que précédemment dans un même volume d'injection, il a également été décidé de rapporter de dernier à 18,4  $\mu$ L au lieu de 69  $\mu$ L, ce qui permet de retrouver une concentration en ARNdb similaire aux concentrations déjà publiées.

### **3.2 Identification de gènes contrôlant l'expression de *colA***

ColA a été identifiée comme un effecteur immunitaire essentiel au confinement intracellulaire de *S. pierantonius* dans les bactériocytes de *S. oryzae* (Login et al., 2011). Le contrôle transcriptionnel du gène codant ColA n'a cependant jamais été investigué. Afin de mieux comprendre les mécanismes du contrôle transcriptionnel de *colA*, nous avons ciblé par iARN cinq gènes candidats, afin de tester l'effet de leur extinction sur l'expression de *colA* et des autres PAMs dans le bactériome. Des études préliminaires de l'équipe (Anselme et al., 2006, Anselme et al., 2008, Vigneron et al., 2012) ont permis d'identifier plusieurs gènes dont le niveau basal d'expression dans le bactériome est très élevé par rapport aux autres tissus de la larve. Les gènes *imd* et *relish*, homologues respectifs de l'intermédiaire de signalisation et du facteur de transcription de la voie IMD de la drosophile, font partie des gènes les plus exprimés. Le gène *tollip*, homologue d'un régulateur de la voie des TLR chez les mammifères (Burns et al., 2000, Zhang and Ghosh, 2002, Didierlaurent et al., 2006), a également été testé en raison de sa forte expression basale. Enfin, les deux gènes les plus fortement exprimés dans le bactériome ont également été ciblés : *megwb* (*most expressed gene in the bacteriome weevil*), qui code pour une protéine de fonction inconnue, et *fk506bp*, homologue d'une immunophiline anti-apoptotique chez les mammifères (Shirane and Nakayama, 2002, Dubois et al., 2003). Les larves ont été disséquées six jours après injection de 50 ng d'ARNdb spécifique de chacun de ces gènes, et une quantification de transcrits a été réalisée sur leurs bactériomes. Ont été quantifiés les transcrits spécifiques du gène codant pour ColA, ainsi que ceux codant pour la Coléoptéricine B (ColB). *colB*, dont la séquence est similaire à celle de *colA*, ne semble pas être directement impliqué dans le confinement des endosymbiotes, et a été choisi comme gène représentatif de l'expression des autres gènes codant des PAMs.



### Niveau d'expression du gène codant pour la Coléoptérine A



### Niveau d'expression du gène codant pour la Coléoptérine B

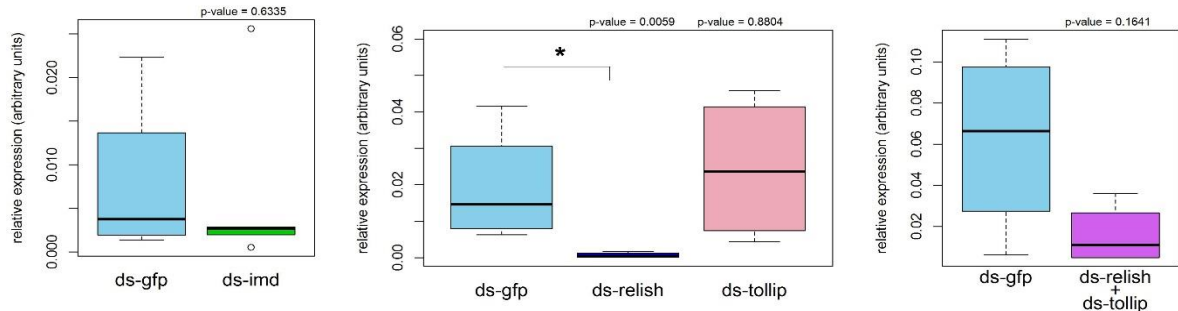


Figure 2 – Quantification des transcrits *colA* et *colB* dans le bactériome larvaire après six jours de traitement par iARN ciblant des gènes fortement exprimés dans cet organe.

Les gènes candidats, *imd*, *relish* et *tollip* (ds-*imd*, ds-*relish* et ds-*tollip*) ont été choisis en raison de leur appartenance présumée à des voies de signalisation immunitaire, et en raison de leur forte expression dans le bactériome par rapport aux autres tissus de la larve. Le gène de la GFP (ds-*gfp*), absent du génome de *S. oryzae* a été choisi comme contrôle pour s'affranchir de l'effet propre de l'injection d'ARNdb. Le niveau d'expression de *colA* et *colB* a été quantifié par RT-qPCR et normalisé par l'expression de deux gènes de ménage. La significativité du traitement a été testée par un t-test de Welch « traité à l'ARNdb » versus « contrôle GFP », sans correction de p-value.

L'extinction individuelle d'*imd*, *relish* ou *tollip* n'a pas d'effet significatif sur l'expression de *colA*, suggérant que le haut niveau basal d'expression de ce gène dans le bactériome ne dépend pas d'une voie IMD-like telle qu'elle est décrite chez la drosophile. En revanche, l'extinction simultanée de l'expression de *relish* et de *tollip* cause une diminution de l'expression de *colA* de 68% (Figure 2, t-test de Welch, p-value = 0,0408). L'expression du gène codant ColB n'est affectée ni par l'extinction de *imd*, ni de *tollip*. L'extinction de *relish* seule cause en revanche une perte de 96% de l'expression basale du gène *colB* (t-test de Welch, p-value = 0,0059). L'extinction simultanée de *relish* et *tollip* cause une tendance à la diminution de l'expression de *colB*, mais non significative (Figure 2). L'extinction de l'expression des deux gènes les plus fortement exprimés dans le bactériome, *megwb* et *fk506bp*, n'a eu aucun effet significatif sur l'expression de ColA ni de ColB (données non présentées).

## 4. Discussion et conclusion

La technique d'interférence à l'ARN permet d'éteindre spécifiquement l'expression d'un gène *in vivo* en dégradant les ARN messagers correspondants (Shi and Mello, 1998, Montgomery et al., 1998, Fire et al., 1998). Cette approche, particulièrement utile pour travailler sur des modèles peu étudiés et sur lesquels les outils génétiques sont limités, a fait ses preuves chez de nombreuses espèces, y compris *S. oryzae* (Vallier et al., 2009, Login et al., 2011). L'utilisation systématique de l'iARN a cependant mis en évidence un effet secondaire chez ce modèle selon les gènes ciblés, consistant en une déstructuration partielle du bactériome chez une fraction des larves allant de 0% à environ 25%. Ce phénotype semble apparaître de façon aléatoire, et n'est pour le moment pas expliqué. La technique d'iARN est inspirée des ARN double brin qui existent naturellement chez les eucaryotes pluricellulaires. Ils sont pris en charge par le complexe Dicer/RISC pour former des petits ARN interférents (pARNi) capables de déclencher la dégradation des ARNm présentant une complémentarité de séquence (Hannon, 2002). La quantité d'ARNdb habituellement injectée chez *S. oryzae* (200 ng) pourrait saturer la machinerie cellulaire responsable du traitement des pARNi endogènes et interférer avec une éventuelle fonction de ces derniers dans le maintien de l'homéostasie du bactériome. L'optimisation des conditions d'injection ont permis d'orienter les futures expériences vers l'utilisation d'une dose de 50 ng dans un volume de 18,4 µL, permettant d'éteindre l'expression d'un gène fortement exprimé sans causer d'effet secondaire perceptible en six jours. L'application de ces nouvelles conditions d'injection a ouvert des perspectives sur la régulation transcriptionnelle du gène codant pour la ColA dans le bactériome. Son utilisation sur des gènes de la réponse immunitaire, éteints individuellement ou par paire, a mis en évidence une singularité de l'expression du gène codant pour la ColA par rapport à celui codant pour la ColB, un PAM a priori non impliqué dans le contrôle de la symbiose chez *S. oryzae*. Le niveau d'expression en conditions standard du gène codant la ColB a été identifié comme strictement *relish*-dépendant dans le bactériome. Le ciblage d'*imd* ne cause pas d'effet significatif en six jours, suggérant que son expression ne dépend pas d'une voie IMD-like. Cette hypothèse est toutefois à prendre avec précaution : la durée de l'expérience (six jours) est probablement trop courte

pour que l'extinction de l'expression d'*imd* ne se répercute sur l'ensemble de la voie de signalisation jusqu'à obtention d'un phénotype transcriptionnel sur les effecteurs. L'éventualité d'une régulation de *colB* et des autres PAMs par une voie IMD-like devra être investiguée par des analyses fonctionnelles supplémentaires.

L'expression du gène codant ColA n'est affectée par l'extinction d'aucun des gènes immunitaires, *imd*, *tollip* ou *relish*, quand ils sont ciblés individuellement. Contrairement à *colB*, l'expression en conditions standard de ce gène n'est donc pas sous contrôle direct de *relish*. En revanche, le ciblage simultané de *tollip* et *relish* donne lieu à une diminution massive de l'expression de *colA*. Chez les mammifères, TollIP agit en amont de la voie des TLR, se liant aux TLR 2 et 4 ainsi qu'à l'intermédiaire de signalisation IRAK4 (Burns et al., 2000, Zhang and Ghosh, 2002). Relish est le dernier intermédiaire de la voie IMD chez la drosophile (Silverman et al., 2000, Rutschmann et al., 2000). Il est donc probable que l'effet observé chez *S. oryzae* lors de leur extinction simultanée implique d'autres acteurs et potentiellement plusieurs voies de signalisation. Il est intéressant de noter que le niveau d'expression standard de *tollip* est élevé dans le bactériome, mais pas dans les autres tissus. Sa forte expression en présence des symbiotes pourrait être un des mécanismes de contrôle tissu-spécifique de l'immunité lié à la symbiose. Des travaux fonctionnels supplémentaires seront requis pour identifier les interacteurs de TollIP et mieux comprendre son implication dans les voies de signalisation immunitaires de *S. oryzae*.

## *CHAPITRE 2*

# *LES INFECTIONS SYSTEMIQUES DECLENCHENT UNE REPONSE IMMUNITAIRE LOCALE DANS LE BACTERIOME LARVAIRE*

# 1. Introduction à l'étude

L'étude présentée dans le premier chapitre de cette thèse a mis en évidence des éléments de régulation d'une réponse immunitaire dans le bactériome qui est dirigée contre les symbiotes et dont le principal effecteur décrit jusqu'à présent est ColA. Cette réponse est intracellulaire, finement régulée et implique l'expression simultanée de *relish* et *tollip*. Login et al. (2011) ont démontré que cette réponse du bactériome, que nous qualifions d'« interne », est fondamentale dans le maintien de l'homéostasie symbiotique. L'implication forte de l'immunité dans le contrôle des endosymbiotes interroge sur la façon dont ce système homéostatique réagit face aux perturbations extérieures, en particulier face à la sollicitation du système immunitaire par une infection bactérienne systémique. Le bactériome est-il immunoréactif, c'est-à-dire capable de répondre à une infection par l'induction de gènes codant des PAMs ? ColA est-elle impliquée dans cette réponse inductible ? Et surtout, son déclenchement en cas d'infection a-t-il un impact sur l'homéostasie symbiotique ?

Afin d'étudier les compétences immunitaires du bactériome et de tester sa capacité à produire des effecteurs immunitaires en réponse à une infection systémique par une bactérie « libre » (i.e. non symbiotique), j'ai comparé les profils d'expression des gènes de la réponse immunitaire entre des insectes témoins et des insectes ayant subi une injection de bactéries à Gram négatif (*Dickeya dadantii*) ou à Gram positif (*Micrococcus luteus*). Six gènes codant des PAMs ont été sélectionnés pour cette étude (*colA*, *colB*, *cecropine*, *sarcotoxine*, *diptéricine* et *défensine*), ainsi que onze gènes immunitaires non-effecteurs incluant des homologues d'intermédiaires de la voie Toll (*wpgpr3*, *GNBP1* et *toll*), de la voie IMD (*wpgpr2*, *imd* et *relish*) et des homologues de gènes régulateurs (*wpgpr1*, *caudal*, *pirk*, *fk506bp* et *tollip*). L'expression de ces 17 gènes a été mesurée en cinétique pendant 24 heures suivant l'infection, d'une part sur des bactériomes disséqués, et d'autre part sur le reste des tissus larvaires, appelé « carcasse » dans la suite de ce travail, et qui approxime la réponse systémique de la larve. Le niveau d'expression de onze de ces gènes, choisis pour leur important différentiel d'expression entre la réponse du bactériome et la réponse systémique, a également été analysé après infection dans le bactériome et dans l'intestin, organe représentant un exemple de

réponse immunitaire de type local. La comparaison des niveaux d'expression des gènes immunitaires au cours de ces trois types de réponse (réponse du bactériome, réponse intestinale locale et réponse systémique) a permis d'établir une « carte d'identité » de la réponse inductible du bactériome. Dans un second temps, j'ai recherché d'éventuels phénotypes de perturbation de l'homéostasie symbiotique après le déclenchement de la réponse immunitaire inductible du bactériome. Pour cela, j'ai comparé en imagerie la morphologie et la structure des bactériomes de larves infectées par des bactéries exogènes avec ceux de larves naïves.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication en janvier 2015 dans *Journal of Innate Immunity*, présentée ci-après.

## 2. Systemic infection generates a local-like immune response of the bacteriome organ in insect symbiosis

Florent Masson<sup>1</sup>, Agnès Vallier<sup>1</sup>, Aurélien Vigneron<sup>1,2</sup>, Séverine Balmand<sup>1</sup>, Carole Vincent-Monégat<sup>1</sup>, Anna Zaidman-Rémy<sup>1</sup> and Abdelaziz Heddi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Lyon, INSA-Lyon, INRA, UMR203 BF2I, Biologie Fonctionnelle Insectes et Interactions, F-69621 Villeurbanne, France

<sup>2</sup>Current address: Department of Epidemiology and Public Health, Division of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, United States of America

\*Corresponding author

Published: 23 January 2015

Masson *et al.*, J Innate Immun 2015;7:290–301

<http://www.karger.com/Article/Abstract/368928>

---

## 1. Abstract

Endosymbiosis is common in insects thriving in nutritionally unbalanced habitats. The cereal weevil, *Sitophilus oryzae*, houses *Sodalis pierantonius*, a Gram-negative intracellular symbiotic bacterium (endosymbiont), within a dedicated organ called a bacteriome. Recent data have shown that the bacteriome expresses certain immune genes that result in local symbiont tolerance and control. Here, we addressed the question of whether, and how, the bacteriome responds to insect infections involving exogenous bacteria. We have established an infection model by challenging weevil larvae with the Gram-negative bacterium *Dickeya dadantii*. We showed that *D. dadantii* infects host tissues and triggers a systemic immune response. Gene transcript analysis indicated that the bacteriome is also immune-responsive, but it expresses immune effector genes to a lesser extent than the systemic and intestinal responses. Most genes putatively involved in immune pathways remain weakly expressed in the bacteriome following *D. dadantii* infection. Moreover, quantitative PCR experiments showed that the endosymbiont load is not affected by insect infection or the resulting bacteriome immune activation. Thus, the contained immune effector gene expression in the bacteriome may prevent potentially harmful effects of the immune response on endosymbionts, whilst efficiently protecting them from bacterial intruders.

---

## 2. Background

Insects thriving on nutritionally unbalanced environment often evolve a mutualistic relationship with symbiotic intracellular bacteria (endosymbionts). Endosymbionts complement the insect's diet with metabolic components and contribute considerably to its adaptability and invasive power (Heddi et al., 1999, Heddi, 2003). A symbiotic relationship such as this can be seen in the cereal weevil (*Sitophilus oryzae*) association with the Gram-negative  $\gamma$ -proteobacterium *Sodalis pierantonius* (Charles et al., 1997, Heddi et al., 1998, Charles et al., 2001, Oakeson et al., 2014). Weevil endosymbionts are transmitted maternally to the insect progeny. At early stages of embryonic development, insects differentiate specialized cells, called bacteriocytes, which group together to form the bacteriome organ in the larva. The bacteriocytes



house endosymbionts and isolate them from the host systemic immune response (Anselme et al., 2008, Reynolds and Rolff, 2008). Endosymbionts are only tolerated inside these specific cells and their externalization from the bacteriocytes results in the activation of a systemic response and the secretion of antimicrobial peptides (AMP). This suggests that efficient mechanisms have been selected, through host-symbiont co-evolution, that allow bacteriocytes to both protect and maintain the symbionts, and to control their localization, growth, and density (Login et al., 2011, Vigneron et al., 2014). In endosymbiotic models, the bacteriome organ exhibits a specific immune transcriptional profile when compared with other tissues (Heddi et al., 2005, Anselme et al., 2006, Anselme et al., 2008, Vigneron et al., 2012, Ratzka et al., 2013). In *S. oryzae*, this includes the intracellular expression of the AMP Coleoptericin A (ColA), which specifically targets endosymbionts and inhibits their cell division through interaction with the chaperonin GroEL (Login et al., 2011). However, the bacteriome immune functions might not be limited to endosymbiont control and they may also help to protect this symbiont-bearing organ from opportunistic pathogen infections that could damage the bacteriocytes, and their associated endosymbionts.

To tackle this question, we have established an infection model in *S. oryzae* weevils by challenging the larvae with the Gram-negative bacteria *Dickeya dadantii*. The humoral immunity of insects to bacterial infections is best described in *Drosophila melanogaster*, where the recognition of bacterial peptidoglycan by Pattern Recognition Receptors (such as the Peptidoglycan Recognition Proteins, PGRP) selectively activates the Toll and IMD signaling cascades (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Both pathways lead to the activation of transcription factors of the NF- $\kappa$ B family and the transcriptional induction of various immune effector genes, such as AMP coding genes. The systemic response relies on the activation of Toll or IMD pathways in the fat body and a massive secretion of AMPs into the insect hemolymph, where they act against bacterial intruders. The local immune responses rely on the activation of the IMD pathway in epithelia that are in contact with bacterial intruders, and which generate a local antimicrobial activity. In this study, tissue-specific analysis of the expression of immune-related genes showed that *D. dadantii* injected into the weevil hemolymph triggers a strong systemic immune response and results in a low, but significant, response from both the midgut and the bacteriome. Although similar to the local intestinal response, the bacteriome response

clearly presented some qualitative and quantitative specificity and appeared to be more contained. Importantly, the endosymbiont load was not affected by insect infections. These results strongly suggest the existence of an immunomodulation process that maintains the bacteriome immunity at a low level of activation, presumably to avoid collateral damage to the endosymbionts and to limit symbiont exposure to bacterial intruders.

---

### 3. Material and Methods

#### 3.1 Insect rearing, infection, and sample preparation

*Sitophilus oryzae* weevils were reared on wheat grains at 27.5°C and at 70% relative humidity. The Bouriz strain of *S. oryzae* was chosen because it is free of any facultative symbionts, such as *Wolbachia*, and it harbors only *S. pierantonius*. Aposymbiotic insects were obtained as previously described (Nardon, 1973). Septic injuries were made on fourth instar larvae challenged with 10<sup>5</sup> bacteria of the genus *Micrococcus luteus* (strain CCM169) or *Dickeya dadantii* (strain A470). 69 nl of bacterial suspension were injected into the hemolymph using a Nanoject II (Drummond).

For convenience, and due to the small larval body size, the whole larva was used to estimate the systemic response since the epithelial immune responses are negligible compared to the strong systemic response generated by the fat body. Aposymbiotic insects were used in this assay, taking advantage that they are devoid of bacteriomes.

For organ-specific studies, bacteriomes and guts were dissected from fourth instar symbiotic larvae in Buffer A (25 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM Sucrose, 35 mM Tris/HCl, pH=7.5). For each sample, at least 4 whole larvae or 20 organs were pooled and stored at -80°C, prior to RNA extraction. Each sampling was repeated three times, independently, for the end-point RT-qPCR, four separate times for the kinetics analysis and five times for the bacterial counts by qPCR, to take into account any individual variability.

### 3.2 Identification of genes of interest

*Cecropin*, *coleoptericin A* and *B*, *diptericin*, *fk506bp*, *GNBP1*, *imd*, *sarcotoxin*, *tollIP*, *wPGRP1*, 2 and 3 were all identified from publications (Anselme et al., 2006, Anselme et al., 2008, Vigneron et al., 2012). *Caudal*, *pirk*, *defensin*, *relish* and *toll* were identified using unpublished RNAseq data. The respective sequences can be found under the following accession numbers: KM034776, KM034777, KM034778, KM034779 and KM034780.

### 3.3 Total RNA extraction and reverse-transcription

Total RNA from whole larvae was extracted with the Trizol reagent (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. RNA was incubated with 1 U/ $\mu$ g of RQ1 RNase-free DNase for 30 min, at 37°C. The total RNA of bacteriomes and guts was extracted using RNAqueous®-Micro (Ambion), which allows for a better RNA yield from small tissue samples. After purification, the RNA concentration was measured with a Nanodrop® spectrophotometer (Thermo Scientific) and RNA quality was checked using agarose gel electrophoresis. Reverse-transcription into the first strand cDNA was carried out using the First Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen).

### 3.4 Real-time RT-qPCR transcript quantification

The quantification was performed with a LightCycler® instrument using the LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). Data were normalized using the ratio of the target cDNA concentration to that of two house-keeper genes: *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*gapdh*) and *ribosomal protein L29* (*rpL29*). The expression of these genes is not significantly influenced by the treatments employed. Primers were designed to amplify fragments of approximately 200 bp. A complete list of the primers can be found in Table S1.

The PCR reactions were carried out in LightCycler 96-well plates in a final volume of 10  $\mu$ l, containing 2.5  $\mu$ l of cDNA samples (diluted fivefold) and 7.5  $\mu$ l of LightCycler® 480 SYBR Green Master 1 mix, with 0.5  $\mu$ l of 10 mM of each primer, 1.5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O and 5  $\mu$ l of Mastermix. After 5 min, at 95°C, the cycling conditions were as follows: 45 cycles at 95°C for 10 s, 56°C for 20 s

and 72°C for 30 s. For product identification, a melting curve was constructed at the end of each PCR by heating, for 30 s, at 66°C and then increasing the temperature up to 95°C with increment rates of 0.11°C/s. Reactions were terminated by cooling at 40°C for 30 s. For each individual sample, the crossing point and the concentration of the gene transcripts were determined. Ratios were then normalized with the *gapdh* and *rpL29* genes.

### 3.5 DNA extraction and qPCR bacterial count

Total DNA was extracted from pools of five larvae by crushing them with an RNase-free pellet pestle and using a NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel). DNA quantification was carried out using the LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). The target was a 200 bp fragment of *NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit CD* (*NuoCD*; primers used were: 5-CACAGCCAAATGTGGTGAAG-3 and 5-GCAGGTCATAGAGCATCACA-3) for *S. pierantonius* quantification and *Indigoidine biosynthesis protein A* (*IndA*; primers used were: 5-TATTGTCGTTCCAGCGGTTT-3 and 5-CCCACGAATACCTTCATGCT-3) for *D. dadantii* quantification. The PCR reactions were carried out in LightCycler 96-well plates in a final volume of 10 µl, containing 1 µl of DNA samples and 9 µl of LightCycler® 480 SYBR Green Master 1 mix, with 0.5 µl of 10 mM of each primer, 3 µl H<sub>2</sub>O and 5 µl of Mastermix. After 10 min, at 95°C, the cycling conditions were as follows: 45 cycles at 95°C for 10 s, 58°C for 10 s and 72°C for 10 s. For product identification, a melting curve was constructed at the end of each PCR by heating for 1 min, at 68°C, and then increasing the temperature up to 95°C with increment rates of 0.11°C/s. Reactions were terminated by cooling at 40°C for 30 s. For each individual sample, the crossing point and the concentration of the DNA fragment were determined. Bacterial DNA quantifications were normalized by using the ratio of the target bacterial gene (*NuoCD* or *IndA*) with that of the host *β-actin* gene (primers used for *β-actin* amplification were: 5-GCCTCAACCTCCCTAGAAAA-3 and 5-GGTGTTGGCGTACAAGTCCT-3).

### 3.6 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

*D. dadantii* localization in insect tissues was analyzed by FISH experiments on whole symbiotic larvae at 6 h, 12 h and 24 h after injection of the bacterial suspension or sterile PBS buffer. Larvae were fixed, at the end of the incubation period, in PBS with 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, cut, and then mounted on poly(L-lysine)-coated microscope slides.

After methylcyclohexan de-waxing and rehydration, sections were covered with a drop of 70% acetic acid. The sections were then pre-hybridized, hybridized with a *D. dadantii*-specific 5'-end TAMRA-labeled oligo-probe targeting 16S RNA (5'-CCC-CGT-ATC-TCT-ACA-GGG-3'), washed, and then mounted in PermaFluor Mounting Fluid (ThermoScientific) containing 3 µg/ml of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), as previously described (Balmand et al., 2013).

Images were acquired with an epifluorescence microscope (Olympus IX81 equipped with a HQ535/50 filter for green signal, D470/40 for blue signal and HQ610/75 for red signal) and captured using an F-ViewII camera and the CellF software (Soft Imaging System). Images were treated and analyzed using ImageJ (release 1.47v).

### 3.7 Statistical analysis

Transcriptomic data on humoral and bacteriome immune response kinetics were analyzed using linear models on the log-transformed gene expression data. The type of treatment was considered as a 3-levels categorical variable representing the injection of sterile PBS (control), *M. luteus* or *D. dadantii*. The time post-infection was considered as a 4-levels categorical variable. A two-way analysis of variance (ANOVA) allowing for interaction between the two factors has been used to assess the significance of each factor and the interaction using Fisher tests. To refine the analysis, a contrast analysis has been run on genes whose expression was significantly affected by the treatment. For models with a significant interaction between the factors “treatment” and “time” (interaction p-value < 0,1), a t-test has been performed for each given time on the linear model coefficients for pairwise contrasts of each level of the factor “treatment”. If the interaction was not significant, a new model has been built without interaction calculation, and the contrasts have been made globally for the 4 levels of the factor “time”. The effect of a factor

was considered significant for  $p\text{-value} < 0,05$ . No adjustments were performed for multiple test comparisons.

Data obtained on the comparison of the bacteriome and the gut immune responses satisfy the requirements for the use of parametrical statistics without any data transformation. The ANOVA and contrast procedure described above have been applied on these data without preliminary manipulation.

All analysis and graphical figures were made using RStudio software v0.98.983 (RStudio, 2012) and Hmisc and nlme packages. Graphical figures represent the mean of all replicates for each point. Error bars represent the standard error calculated as  $\sigma/\sqrt{n}$  where  $\sigma$  is the sample standard deviation and  $n$  the sample size.

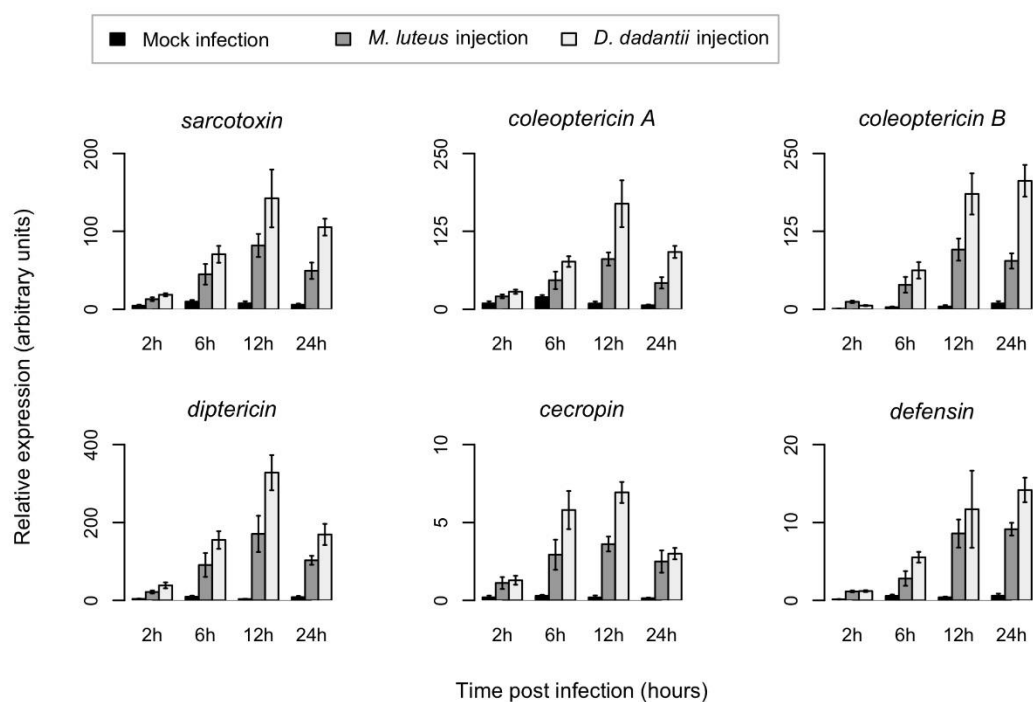
---

## 4. Results

### 4.1 *D. dadantii* infection triggers an efficient systemic immune response in weevil larvae

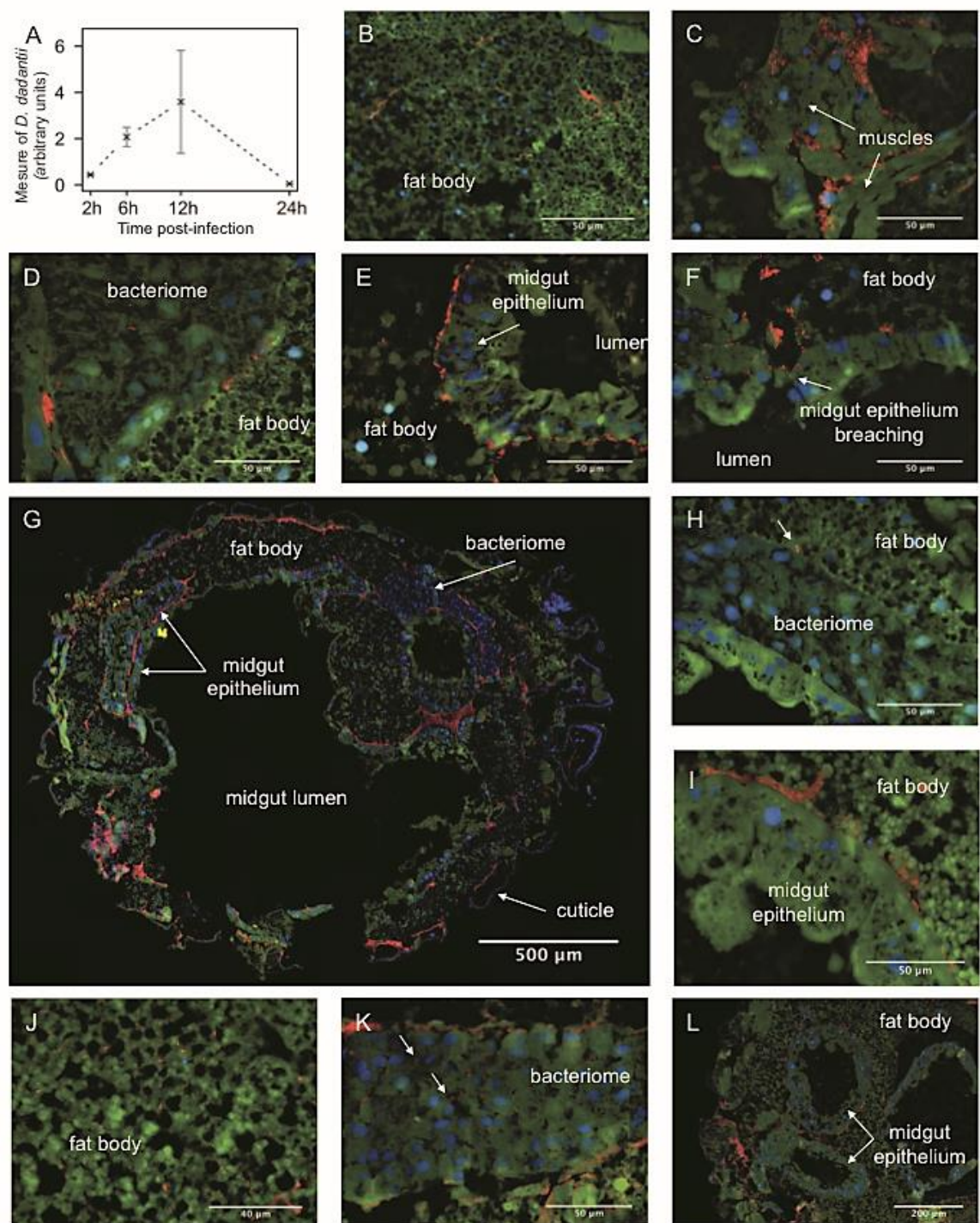
To investigate whether the bacteriome generates an immune response to systemic infections with pathogens, we set up an infection model in *S. oryzae* larvae. Insects were infected by an injection of bacteria into the body cavity (hemocoel) using the Gram-negative bacteria *D. dadantii* (formerly *Erwinia chrysanthemi*). *D. dadantii* is known to be virulent for aphids, and to have a pathogenic effect when injected into *S. oryzae* larvae (Grenier et al., 2006, Costechareyre et al., 2012). Bacteria injected into insects is known to trigger a systemic immune response generated by their fat body, together with local immune responses from epithelial cells directly exposed to bacteria (Lemaitre and Hoffmann, 2007). However, these two types of response had not been previously assessed in a *Sitophilus/Dickeya* infection model.

The systemic immune response was evaluated by measuring, with Reverse Transcription quantitative PCR (RT-qPCR), the transcript levels of six AMP coding genes: *sarcotoxin*, *coleoptericon-A* (*colA*), *coleoptericon-B* (*colB*), *diptericin*, *cecropin* and *defensin*. Infections with the Gram-positive bacteria *Micrococcus luteus* were carried out in parallel for comparison. To prevent any



**Fig. 1. Kinetics of AMP gene expression in whole aposymbiotic larvae injected with *M. luteus* or *D. dadantii*.** The effect of the type of injection and the effect of time are statistically significant for all genes. For detailed statistical results, see online supplementary tables 2 and 3. Error bars represent the standard error of four independent measurements.

interference of symbiosis with the infection status, and to avoid any contamination of the systemic immune response by a bacteriome response, we used aposymbiotic insects, which are artificially deprived of endosymbionts (Nardon, 1973) and do not grow a proper functional bacteriome. All of the AMP coding genes were strongly activated in whole larvae following these infections. Their expression was slightly higher in response to Gram-negative bacteria, compared to Gram-positive bacteria (Fig. 1). Except for the *coleoptericin B* and the *defensin*, which presented stable transcript levels from 12 h to 24 h post-infection, all the genes presented similar profiles of expression whereby the highest transcript level was reached 12 h after bacterial injection, followed by a decrease towards 24 h (Fig. 1).



**Fig. 2. Tissue distribution of *D. dadantii* in infected symbiotic larvae.** (a) Kinetics of *D. dadantii* counts in whole infected larvae. Bacteria count increases from 2 to 12 h after the injection. At 24 h postinjection, the count falls under the detection limit, indicating bacterial clearance in surviving larvae. Error bars represent the standard error of five independent measurements. At 6 h postinfection, *D. dadantii* could be seen in most tissues of symbiotic larvae, including the fat body (b), muscles (c) and bacteriome (d). It had also accumulated along the gut epithelium (e), sometimes causing damage (f). Bacteria were, however, never found inside the host cells. At 12 h postinfection, *D. dadantii* was found mostly on the borders of the organs (g). In surviving larvae, bacteria were seen as small stacks along the bacteriome (h) and the gut epithelium (i) only. In larvae dying from infection, the bacteria had spread to all the tissues, including the fat body (j), the bacteriome (k) and the gut (l).

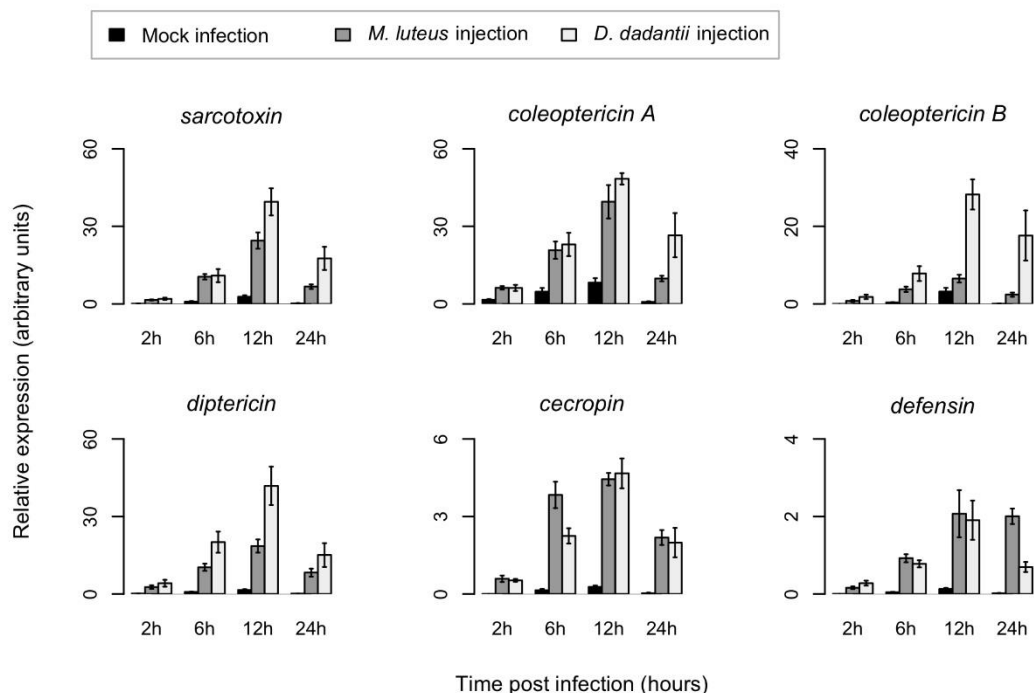


The infectious efficacy of *D. dadantii* was monitored by evaluating its ability to grow and spread throughout the insect tissues. Bacterial quantification, using quantitative PCR (qPCR), showed that the *D. dadantii* population increased from 2 h to 12 h after infection, before being eliminated by 24 h (Fig. 2A). *D. dadantii* infection of insect tissues was then monitored using Fluorescent in Situ Hybridization (FISH). We looked at the localization of the infectious bacteria through various insect tissues, including the bacteriome. Because aposymbiotic insects do not grow a proper bacteriome, and to take into account the potential interaction between symbiotic and infectious bacteria, we used whole larvae from the symbiotic strain as biological material. At 6 h post-injection, *D. dadantii* could be seen sporadically inside most larval tissues, including the fat body (Fig. 2B), muscles (Fig. 2C) and the bacteriome organ (Fig. 2D). *D. dadantii* was also relatively abundant in the more concealed areas, such as the boundary region of the bacteriome organ or the basal border of the gut epithelium (Fig. 2E), where bacteria were sometimes associated with damaged intestinal epithelial cells (Fig. 2F). After 12 h, *D. dadantii* was less abundant inside the tissues but, instead, it had accumulated as stacks at the borders of the organs (Fig. 2G, 2H, 2I). However, it is worth noting that a strong variability was observed between larvae, depending on how well they had coped with the infection. Healthy-looking larvae housed few *D. dadantii* whereas in unhealthy larvae, with a greenish color, *D. dadantii* had colonized most tissues, including the fat body (Fig. 2J), the bacteriome (Fig. 2K) and the gut tissues (Fig. 2L). By 24 h post-infection, no sign of *D. dadantii* was detected in the surviving larvae.

In conclusion, *D. dadantii* was able to infect *S. oryzae* larvae, to spread inside the organism, and to trigger a strong systemic response of the larvae. Survival assays showed that about 50% of the larvae died within 24 h following the infection (see Fig. S1), while in surviving larvae no infectious bacteria were detected at this time (Fig 2A). Thus, we assumed that all infected larvae that were able to survive had successfully eradicated the infection by 24 h, while others died either from the infection itself, or from the strong immune response they triggered.

## 4.2 The bacteriome generates a mild, but effective, immune response following bacterial infection

To determine whether, and how, the bacteriome responds to a larval bacterial challenge, we infected a weevil symbiotic strain with *D. dadantii*. The AMP gene expression was measured in the dissected bacteriomes. *Diptericin*, *sarcotoxin*, *cecropin*, *defensin* and *coleoptericin A* and *B* genes were all induced in the bacteriome after infection with either *D. dadantii* or *M. luteus*, as compared with mock-infection controls (Fig. 3). The kinetics of these AMP gene expressions in the bacteriome mimic the profiles obtained of the systemic response generated by the fat body (compare Fig. 1 and Fig. 3). However, normalized transcript levels of the AMP genes show a higher induction in the systemic response than in the bacteriome. 12 h after injection, the mean fold-change for the six AMP genes, between *D. dadantii*-infected and mock-infected larvae, was 42-fold for the systemic response and only 14.5-fold for the bacteriome response.



**Fig. 3. Bacteriome immune response in symbiotic larvae injected with *M. luteus* or *D. dadantii*.** AMP gene expression was quantified at 2, 6, 12 and 24 h after the bacterial challenge. The effect of the type of injection, the effect of time and their interaction are statistically significant for all genes. For detailed statistical results, see supplementary tables 2 and 3. Error bars represent the standard error of four independent measurements.

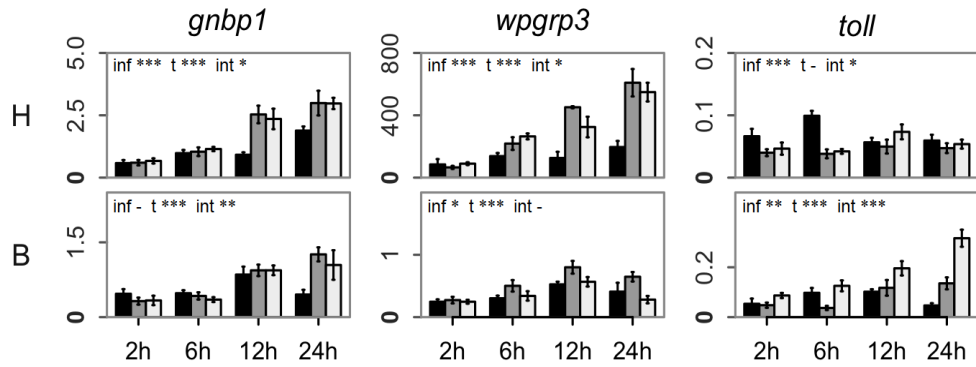
To elucidate the reasons for these differences, we measured the expression profile of genes homologous to key components of *Drosophila melanogaster* antimicrobial NF- $\kappa$ B pathways, i.e. the Toll pathway (GNBP1, wPGRP3 and *toll*) and the IMD pathway (wPGRP2, *imd* and *relish*), together with putative regulators of these pathways (wPGRP1, *caudal*, *pirk*, *fk506bp* and *tollip*) (see Fig. 4 for expression profiles and Table S3 for the statistical analysis). In contrast to the results obtained for AMP gene expression, only three genes out of eleven showed the same type of transcriptional profile in both the systemic and bacteriome response, when statistically analyzing the effect of time post-infection and of treatment. The weevil *peptidoglycan recognition protein 1* (*wpgpr1*), *pirk* and *relish*, which are homologous to the *D. melanogaster* negative regulators *pgpr-lb*, *pirk* and the NF- $\kappa$ B transcription factor *relish*, respectively, were significantly induced in both systemic and bacteriome responses following infection.

The expression of 6 of the 11 genes analyzed was either induced in the systemic response but not in the bacteriome, or not affected in the systemic response but repressed in the bacteriome. For example, the expression of genes encoding the putative receptors Peptidoglycan Recognition Protein 3 (wPGRP3) and the Gram-Negative Binding Protein 1 (GNBP1) significantly increased in the systemic response following infection. Interestingly, no significant induction was observed for these genes in the bacteriome. The expression of the *imd* gene was not affected in the systemic response but was repressed in the bacteriome at 2 h and 6 h after both types of infection (i.e. with Gram positive and Gram negative bacteria), before returning to the level of the mock-infected control at

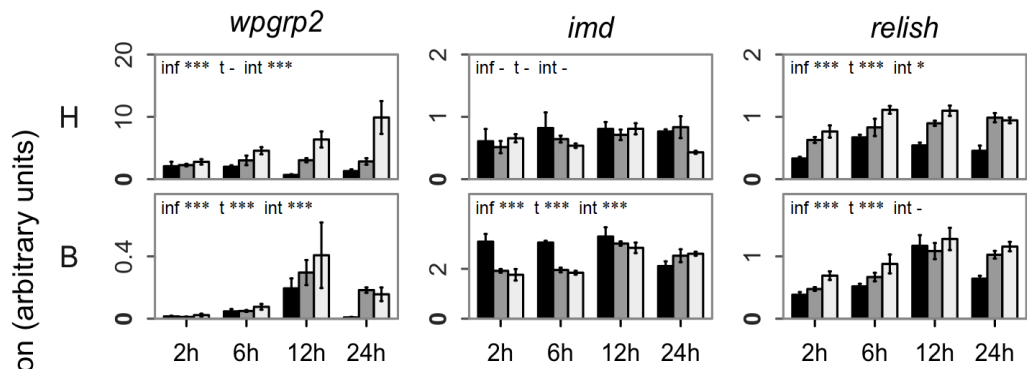
**Fig. 4. Expression kinetics of immune-related genes observed for humoral (H) and bacteriome (B) responses in larvae injected with *M. luteus* or *D. dadantii* .** →

Whole aposymbiotic larvae were used to assess the systemic humoral immune response; symbiotic larvae were used to measure the bacteriome-specific response. Statistical results from the global two-way ANOVA analysis are displayed on each graph with inf the infection type, t the time postinfection and int their interaction. –  $p > 0.05$ ; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Detailed p values and full contrast analysis results are displayed in online supplementary tables 2 and 3. Error bars represent the standard error of four independent measurements.

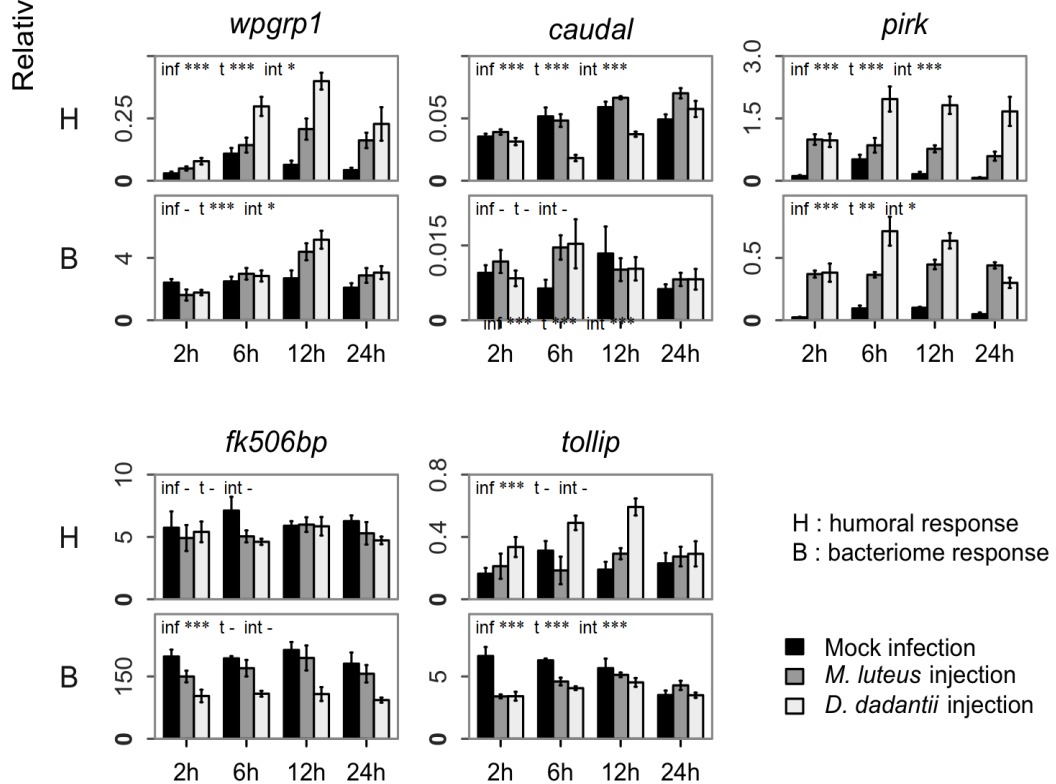
## TOLL PATHWAY



## IMD PATHWAY



## REGULATORY GENES



H : humoral response  
B : bacteriome response

■ Mock infection  
■ *M. luteus* injection  
□ *D. dadantii* injection

12 h. The *fk506bp*, which encodes an uncharacterized putative activator of the immune response through cytokine signaling (Dubois et al., 2003) and an apoptosis inhibitor in vertebrates (Shirane and Nakayama, 2002), was also down-regulated after a Gram-negative infection in the bacteriome, whereas no significant changes were observed in the systemic response. The difference between the systemic and the bacteriome responses was even more striking in the case of *tollip*, a putative negative regulatory gene (Zhang and Ghosh, 2002) that was induced by Gram-negative infection in the systemic response and repressed by both types of infection in the bacteriome, from 2 h to 12 h post-infection.

Finally, two genes were transcriptionally repressed in the systemic response but maintained, or even induced, in the bacteriome following infection. The expression of the regulatory gene *caudal* was not modified in the bacteriome after infection, but was slightly repressed by Gram-negative infection in the systemic response. The *toll* gene, encoding a membrane receptor of the Toll pathway, was repressed in the systemic response shortly after both types of bacterial infection. Its transcript level went back to the control level 12 h after treatment. Within the bacteriome, this gene expression was unchanged during the first hours following infection but it was significantly induced 24 h after infection with Gram-negative bacteria.

From these results, the bacteriome immune response appeared to be qualitatively, and quantitatively, different from the systemic immune response.

#### **4.3 The bacteriome response differs from the gut local immune response**

Our data indicate major differences between the systemic and the bacteriome immune responses in *S. oryzae* larvae. Such quantitative and qualitative differences in AMP gene expression, between the humoral and the so-called local immune response, had already been described in *Drosophila* (Liehl et al., 2006, Gendrin et al., 2009). The next step was to compare the bacteriome and the larval gut responses. The insect gut is known to generate a local immune reaction in response to oral bacterial infections (Ferrandon et al., 1998, Tzou et al., 2000). But to our knowledge, whether the gut can also respond to systemic infection generated by a direct injection of bacteria into the hemocoel had not been previously investigated. We chose to analyze gene expression at

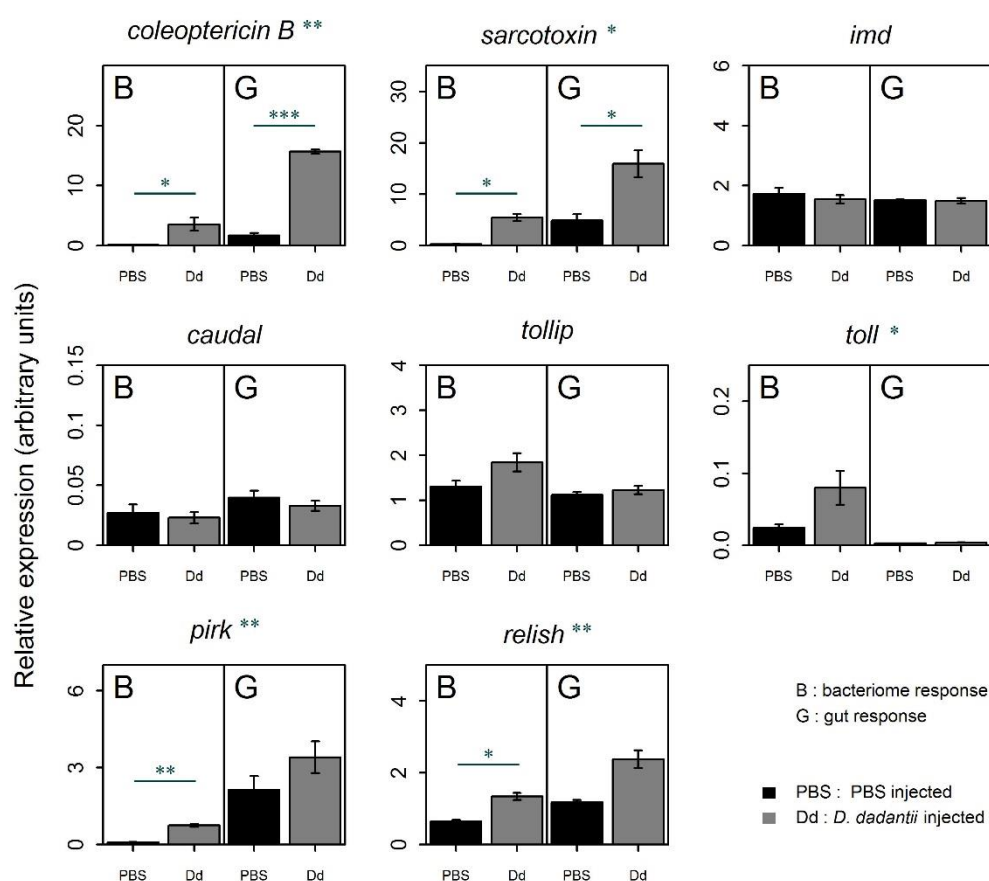


Fig. 5. Expression of immune-related genes in the bacteriome (B) and gut (G) of symbiotic larvae 6 h after *D. dadantii* infection.

Asterisks attached to gene names indicate a significant difference in global expression levels between B and G from a two-way ANOVA analysis. Asterisks on the bar plots indicate a significant difference between infected and control conditions within one organ from a Welch two-sample t test (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). Error bars represent the standard error of three independent measurements. PBS = PBS injected; Dd = *D. dadantii* injected.

6 h following *D. dadantii* injections, when differences between the humoral and the bacteriome responses were the most striking. Expressions of all the genes monitored previously were measured in the gut of infected symbiotic individuals, except for those encoding the PGRP1, 2, 3 and the GGBP1 proteins because their differential expression was only observed after at least 12 h post-infection in the systemic response study (Fig.5). *Sarcotoxin* and *coleopteracin B* were chosen as representative AMP genes. Our data showed that the expression of these AMP genes was significantly up-regulated following bacterial infection in both tissues, and that their expression level was slightly, but significantly, higher in the gut than in the bacteriome (Fig. 5). *Relish*, which

encodes a homologue of the transcription factor that activates the Imd-dependent AMP expression in *Drosophila* (Hedengren et al., 1999), was also more highly expressed in the weevil gut, when compared with the bacteriome. Its up-regulation upon infection of the larva is significant in the bacteriome, supporting the results of the kinetics study. A similar up-regulation tendency is observed in the gut although not statistically significant (Fig. 5). *pirk*, a homologue of the *Drosophila pirk* regulator, the expression of which is *relish*-dependent in the fruit fly (Kleino et al., 2008, Lhocine et al., 2008), showed higher expression in the gut, when compared with the bacteriome (Fig. 5). Finally, the *toll* gene, encoding for a Toll pathway receptor, showed no significant expression in the gut but it was expressed, and slightly induced, in the bacteriome after injecting *D. dadantii* (Fig. 5). The remaining three genes analyzed, *imd*, *caudal* and *tollip*, showed no significant difference between the bacteriome and the gut. Overall, our data demonstrated that the bacteriome presents a specific immune signature that differs from both the systemic and the gut local immune responses.

#### 4.4 The bacteriome response to systemic infections does not affect resident endosymbiotic bacteria

We have reported above that the bacteriome generates an immune response after systemic bacterial infection. This response is produced by an organ whose main function is to house, and to tolerate, endosymbiotic bacteria. Interactions

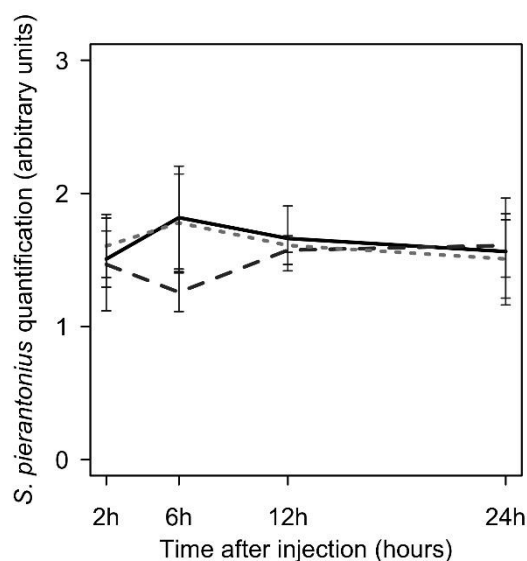


Fig. 6. *S. pierantonius* quantification in whole symbiotic larvae from 2 to 24 h after *D. dadantii* or *M. luteus* infection. The solid line represents the mock infection, the dashed line indicates infection with *D. dadantii* and the dotted line shows infection with *M. luteus*. No significant difference was found between infected and control larvae. Error bars represent the standard error of five independent measurements.

with exogenous bacteria, and the subsequent immune response that they trigger, could be harmful for endosymbionts. To highlight any eventual noxious effects of the immune response on symbiosis, we quantified, by qPCR, the *S. pierantonius* endosymbionts over the course of a *D. dadantii* infection (Fig. 6). Remarkably, the *S. pierantonius* load was not significantly different in infected larvae, when compared with mock-infected larvae, suggesting that the bacteriome immune reaction does not harm the resident endosymbiotic bacteria.

## 5. Discussion

The interplay between innate immunity and endosymbiosis has been the focus of several studies over the last few years. In particular, questions concerning host tolerance to long-term symbiotic bacteria and the impacts of host-symbiont co-evolution on the development and adaptation of the host immune system remained unanswered (Heddi et al., 2005, Anselme et al., 2006, Gross et al., 2009, Douglas et al., 2010, Login et al., 2011, McFall-Ngai et al., 2012). Remarkably, insects have selected a unique compartmentalization strategy that consists of secluding endosymbionts within the bacteriome. This seclusion limits endosymbiont exposure to host systemic responses and allows the expression of a specific cell program for symbiont maintenance and control inside the bacteriocytes. Transcriptomic studies have revealed that the bacteriome expresses specific immune genes involved in bacteriome immunomodulation and symbiont control (Nakabachi et al., 2005, Gross et al., 2009, Ratzka et al., 2013). In weevils, we have demonstrated recently that the bacteriome activates a limited number of immune effectors, including the AMP ColA (Anselme et al., 2008). The ColA peptide was shown to specifically target endosymbionts, inhibit their cell division, and prevent endosymbiont externalization from this bacteria-bearing organ (Login et al., 2011). However, the bacteriome immune functions may not be limited to symbiont control. They may also include protection of both the bacteriocytes and their bacterial inhabitants against opportunistic exogenous pathogens. To address this question, we have set up a model of systemic infection by *D. dadantii* in *S. oryzae* larvae. We have shown that *D. dadantii* was able to spread through the larval tissues within the initial 12 h period following injection into the



hemolymph. Nearly 50% of the infected individuals succumb to *D. dadantii*, whilst surviving larvae succeeded in completely eliminating the bacteria 24 h after injection, demonstrating the efficiency of the weevil cellular and humoral immune responses but also highlighting the variability between individual insects. At the initial stages of infection, *D. dadantii* was located in almost all the tissues, including the fat body, the gut and the bacteriome. 12 h post-infection, a strong disparity was observed depending on how efficiently the larvae had coped with the infection. In dying larvae, *D. dadantii* had spread through all the tissues and the bacteria were massively associated with the gut epithelium and the bacteriome (Fig. 2). In healthy-looking individuals, only a few bacteria were present in the fat body, suggesting that the systemic immune response was efficient enough to clear the infection. Remarkably, the remaining bacteria retreated between the fat body and the other insect tissues, including the gut and the bacteriome, but they did not succeed in penetrating them, presumably because of the local immune activity. 24 h after infection, all the surviving larvae had completely eliminated *D. dadantii* and continued their development and metamorphosis into the adult stage.

Using the above model of infection, we showed that the weevil bacteriome generated an immune response following systemic infections with exogenous bacteria. This response includes the expression of various AMP genes. A comparison between the bacteriome and the systemic immune responses indicated that the same AMP genes were expressed in both cases in response to infections. Although levels of AMP gene expression attended to be higher after a Gram-negative infection than after a Gram-positive infection, the differences were not statistically significant. This suggests that either the larval immune system does not induce specific transcriptional responses to these two pathogen types, or that the differential responses rely on the transcription of genes that were not tested in this study.

Although qualitatively similar, the bacteriome and systemic immune response differ strongly in terms of the AMP gene induction levels, which were much higher in the systemic response than in the bacteriome. This is in line with previous analyses of local-type responses, such as the intestinal response to oral infection (Tzou et al., 2000, Basset et al., 2000).

Interestingly, when comparing AMP gene steady-state levels between the bacteriome and the gut 6 h after bacterial injection into the body cavity, we observed that AMP genes were activated in the gut following systemic

infection. As far as we know, this is the first report of the activation of a gut immune response following an insect systemic infection. It indicates that the gut epithelium can mount an immune response not only to any bacteria present in the intestinal lumen but also to bacteria present in the body cavity. AMP gene expression showed similar kinetics of induction, and a similar order of magnitude, between the gut and the bacteriome. However, AMP transcript levels were slightly, but significantly, higher in the gut, suggesting specific regulations of the immune response in both tissues. To investigate the bacteriome specificities further, we measured the transcript levels of genes homologous to the immune pathway components and regulators. Following infection, most of the genes studied were differentially expressed between the gut and the bacteriome responses, and five out of the eight genes analyzed were differentially expressed between the gut and the bacteriome after infection, including the *colB*, *sarcotoxin*, *relish*, *pirk* and *toll* genes. In *Drosophila*, the local immune response is dependent on the activation of the IMD pathway, via the translocation of the NF- $\kappa$ B transcription factor *relish* to the nucleus, resulting in the transcriptional activation of the AMP genes (Tzou et al., 2000, Onfelt Tingvall et al., 2001). *Pirk*, a negative regulator of the IMD pathway, is itself under the transcriptional control of *relish* (Kleino et al., 2008, Lhocine et al., 2008). Since *relish*, AMP genes and *pirk* are all induced in the bacteriome following infection, we assume that at least one immune pathway is fully functional in the bacteriome, and that this pathway is closely related to the *Drosophila* IMD pathway. The fact that this IMD-like pathway is only slightly induced in the bacteriome, as compared with the gut, supports the hypothesis of a modulated immunity in this symbiotic organ.

A functional analysis of weevil genes will now be required to test whether putative regulators assume a similar immunological function, as in the fruit fly immune pathways, and to determine their precise role in the bacteriome immune regulation.

Importantly, endosymbiont quantification showed no reduction in the size of the endosymbiotic community during the infection period, compared with mock-infected controls. This indicates that the bacteriome immune response does not damage the resident endosymbiotic population, at least in terms of bacterial density. This effective protection of the endosymbionts during the course of an immune response could be partially due to the modulated, mild response generated by the bacteriome. An additional level of endosymbiont

protection may rely on the existence of a predicted signal peptide in most weevil AMP gene sequences (Anselme et al., 2008). Secretion of bacteriome AMPs to the basal border of the organ would allow endosymbionts to avoid contact with mature AMPs. As maintaining endosymbionts is essential for the weevil's physiological performance (Nogge, 1976, Douglas, 1989, Wilkinson, 1998), it is likely that several functionally redundant mechanisms have been selected to ensure endosymbiont protection against the host immune responses.

To conclude, this work provides new insights regarding the bacteriome immune response to systemic infections. In parallel with the permanent immune response that targets endosymbionts (Login et al., 2011), we have demonstrated that the bacteriome generates an inducible local-like immune response when the host is challenged with a systemic infection involving exogenous bacteria. This response may prevent pathogens from entering the bacteriome and engaging in competition with the endosymbionts. Qualitatively, the bacteriome response is relatively similar to the gut local response but it exhibits a lower activation level of AMP gene expression, which may prevent any harmful effects on the endosymbiotic population. These data suggest that the bacteriome has developed a specific, fine-tuned immune response with the dual function of protecting the resident endosymbiotic population from both exogenous infectious bacteria and from the host immune response itself. In this way, host-symbiont co-evolution would seem to have developed a form of bacteriome immunity that preserves and protects the endosymbionts.

---

## 6. Acknowledgments

This work was supported by INRA, INSA-Lyon, and the French ANR-10-BSV7-170101-03 (ImmunSymbArt) and ANR-13-BSV7-0016-01 (IMetSym). We would like to thank V. E. Shevchik and G. Condemine for supplying the A470 *D. dadantii* strain, and F. Subtil for his help and advices regarding the statistical analysis.

### 3. Principaux résultats et conclusion

L'objectif de ce deuxième chapitre était de tester la capacité du bactériome à répondre aux infections systémiques de la larve par des bactéries libres, afin de mieux comprendre les mécanismes immunitaires qui caractérisent ce tissu. Les expériences d'injection des larves par des bactéries pathogènes et de quantification des transcrits de gènes ont montré que l'expression des gènes codant des PAMs sont induits dans le bactériome en réponse à l'injection de bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ces résultats démontrent l'existence d'une réponse immunitaire inductible dans le bactériome, coexistant avec la réponse interne impliquée dans l'homéostasie symbiotique. Un des points les plus intrigants de cette réponse est l'induction, en cas d'infection, du gène codant pour la ColA. En conditions standard, ColA reste intracellulaire dans le bactériome (Login et al., 2011). Or, chez la drosophile, les PAMs produits lors de l'éllicitation d'une réponse immunitaire systémique ou locale sont sécrétés par les tissus dans lesquels les gènes correspondants ont été induits (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Le gène *colA* possède une séquence signal (Anselme et al., 2008), suggérant la sécrétion de sa protéine à la fin de sa synthèse. Si la sécrétion de ColA en cas d'infection se confirme, l'implication de ce gène à la fois dans la réponse interne et dans la réponse externe du bactériome soulèvera des questions quant à la gestion de cette séquence signal par la machinerie cellulaire et quant à la double localisation (intra- et extracellulaire) de ce PAM en conditions d'infection systémique.

Bien qu'impliquant les mêmes effecteurs (PAMs), la réponse du bactériome se différencie de la réponse systémique sur deux aspects : le niveau d'induction des gènes effecteurs est plus faible dans la réponse du bactériome, et un nombre plus restreint de gènes régulateurs montre un changement d'expression après infection de la larve. Elle se différencie également de la réponse immunitaire locale de l'insecte développée par l'intestin. Bien qu'impliquant l'induction des mêmes gènes, la réponse du bactériome est quantitativement plus faible que la réponse intestinale. Le fait que les gènes codant des effecteurs immunitaires soient maintenus à des niveaux d'expression plus faibles dans le bactériome que dans les autres organes en cas d'infection systémique suggère une régulation tissu-spécifique dans cet organe. Cette régulation, qui pourrait aussi

impliquer des mécanismes épigénétiques, ou des signaux immuno-modulateurs provenant des endosymbiotes, reste à analyser.

Aucune différence de nombre de symbiotes ou de structure du bactériome n'a pu être détectée entre les larves infectées par *D. dadantii* et les larves contrôle. Ceci suggère que, dans nos conditions expérimentales, le bactériome est capable de générer une réponse inductible en cas d'infection sans altérer le contrôle immunitaire interne dirigé contre les endosymbiotes. En tant qu'organe immunoactif, le bactériome ne se limiterait donc pas à une fonction de confinement intracellulaire des endosymbiotes, mais également à une fonction de protection de ces derniers contre les agressions extérieures.

## *CHAPITRE 3*

# *LA DYNAMIQUE ENDOSYMBIOTIQUE DE L'INTESTIN ADULTE EST ASSOCIEE A UN BRIDAGE DE L'IMMUNITE*

# 1. Introduction à l'étude

La larve de *S. oryzae* présente une symbiose « stable ». Le nombre d'endosymbiotes augmente sensiblement au cours des quatre stades larvaires, mais l'état morphologique et cellulaire du bactériome demeure relativement stable. Les régulations immunitaires de l'homéostasie endosymbiotique larvaire ont été largement abordées dans le travail présenté dans les chapitres 1 et 2, dans lesquels nous avons montré l'existence de deux réponses immunitaires dans le bactériome. La première, qualifiée d'« interne », est intracellulaire et dirigée contre le symbiote pour assurer son confinement. La seconde, qualifiée d'« externe », est inductible et est probablement dirigée contre les bactéries exogènes en cas d'infection systémique de la larve. Ces deux réponses assurent à la fois le maintien et la protection des endosymbiotes pendant la vie larvaire. Lors de la métamorphose de l'insecte, l'état homéostatique larvaire laisse place à un état dynamique au cours duquel le bactériome se restructure, passant d'un seul organe bien délimité chez la larve à une multitude de petits bactériomes situés à l'extrémité de chacun des caeca mésentériques chez l'adulte. Outre ce changement de localisation et de nombre des bactériomes, les endosymbiotes montrent une dynamique très contrastée au cours des deux premières semaines de vie adulte. Leur nombre augmente drastiquement jusqu'au sixième jour suivant la mue finale, qui intervient immédiatement à la fin de la métamorphose. Il a été montré que cette augmentation permet de répondre aux besoins métaboliques grandissants de l'imago pendant la synthèse de sa cuticule (Vigneron et al., 2014). Une fois cette synthèse achevée, les symbiotes sont éliminés et recyclés par des mécanismes d'autophagie et d'apoptose (Vigneron et al., 2014). Ce troisième et dernier chapitre s'intéresse aux changements de régulation génétique qui permettent le passage de l'état symbiotique stable chez la larve à l'état dynamique chez l'adulte. Quelles sont les voies de signalisation et les processus cellulaires impliqués dans la régulation de la dynamique symbiotique ? L'immunité joue-t-elle un rôle dans l'élimination et le recyclage des endosymbiotes ?

L'identification des processus impliqués dans la dynamique symbiotique a été réalisée par une approche de séquençage d'ARN total (RNAseq) de l'intestin (incluant l'intestin et les bactériomes portés par les caeca). Nous avons analysé

les données transcriptomiques provenant des trois stades suivants : premier jour (J1), sixième jour (J6) et neuvième jour (J9) suivant la mue finale de l'imago, correspondant respectivement au premier jour d'accroissement du nombre d'endosymbiotes, au jour où ils atteignent leur nombre maximal, et à la fin du processus de recyclage symbiotique. Les résultats du RNAseq ont été analysés par une méthode d'annotation utilisant l'orthologie des transcrits avec la base de données Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Cette méthode a été choisie car elle permet l'identification de voies de signalisation de façon plus précise que les annotations basées sur les Gene Ontology (GO), plus fréquemment utilisées. L'analyse KEGG a mis en évidence plusieurs processus et voies de signalisation dont l'activité était corrélée à la dynamique symbiotique. Ces corrélations ont été confirmées par le suivi en cinétique de l'expression de gènes représentatifs de chaque voie par RT-qPCR. De façon surprenante, aucune voie de signalisation régulant la synthèse de PAMs n'a été identifiée lors de l'analyse KEGG. Des analyses complémentaires en RT-qPCR sur des régulateurs immunitaires, ainsi que des observations du processus de recyclage des endosymbiotes en microscopie ont été réalisées afin de comprendre pourquoi l'immunité ne semblait pas sollicitée durant la dynamique symbiotique.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication en octobre 2015 dans *BMC Genomics*, présentée ci-après.



## 2. Weevil endosymbiont dynamics is associated with a clamping of immunity

Florent Masson<sup>1</sup>, Yves Moné<sup>1,3</sup>, Aurélien Vigneron<sup>1,4</sup>, Agnès Vallier<sup>1</sup>, Nicolas Parisot<sup>1</sup>, Carole Vincent-Monégat<sup>1</sup>, Séverine Balmand<sup>1</sup>, Marie-Christine Carpentier<sup>2</sup>, Anna Zaidman-Rémy<sup>1</sup> and Abdelaziz Heddi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Lyon, INSA-Lyon, INRA, UMR203 BF2I, Biologie Fonctionnelle Insectes et Interactions, F-69621 Villeurbanne, France

<sup>2</sup>Université de Lyon, CNRS, UMR5558 LBBE, Laboratoire de Biométrie et de Biologie Évolutive, F-69621 Villeurbanne, France

<sup>3</sup>Current address: Université Montpellier 2, INRA, UMR 1333 DGIMI, Diversité, Génomes et Interactions Micro-Organismes Insectes, F-34095 Montpellier, France

<sup>4</sup>Current address: Department of Epidemiology and Public Health, Division of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, United States of America

\* Corresponding author

Accepted: September 2015

Masson *et al.*, BMC Genomics 2015 ; 16:819

---

## 1. Abstract

### 1.1 Background

Insects subsisting on nutritionally unbalanced diets have evolved long-term mutualistic relationships with intracellular symbiotic bacteria (endosymbionts). The endosymbiont population load undergoes changes along with insect development. In the cereal weevil *Sitophilus oryzae*, the midgut endosymbionts *Sodalis pierantonius* drastically multiply following adult metamorphosis and rapidly decline until total elimination when the insect achieves its cuticle synthesis. Whilst symbiont load was shown to timely meet insect metabolic needs, little is known about the host molecular and immune processes underlying this dynamics.

### 1.2 Results

We performed RNA-seq analysis on weevil midguts at three representative phases of the endosymbiont dynamics (i.e. increase, climax and decrease). Functional analysis of the host differentially expressed genes showed that the main transcriptional changes occur during endosymbiont growth phase and affect cell proliferation, apoptosis, autophagy, phagocytosis, and metabolism of fatty acids and nucleic acids. To screen genes which transcriptional changes are specifically related to symbiont dynamics and not to the intrinsic development of the midgut, we further have monitored by RT-qPCR sixteen gene transcript levels in symbiotic and artificially non-symbiotic (aposymbiotic) weevils. We showed that symbiont dynamics alters the expression of several genes involved in insect development. Our results also strengthened the implication of apoptosis and autophagy processes in symbiont elimination and recycling. Remarkably, apart from the *coleopteracin A* that is known to control symbiont division and location, no gene coding antimicrobial peptide was upregulated during the symbiont growth and elimination phases.

### 1.3 Conclusion

We show that endosymbiont dynamics parallels numerous transcriptional changes in weevil developing adults and affects several biological processes, including metabolism and development. It also triggers cell apoptosis, autophagy and gut epithelial cell swelling and delamination. Strikingly, immunity is repressed during the whole process, presumably avoiding tissue inflammation and allowing insects to optimize nutrient recovery from recycled endosymbiont.

---

## 2. Background

Insects colonize various nutritional niches, including highly unbalanced media like plant sap or cereal grains, which are rich in carbohydrates but lack components essential for animal growth and reproduction. Some species have evolved permanent relationships with intracellular bacteria (endosymbionts) that complement their diet, hence increasing their fitness and invasive power by allowing the host to overcome the environment nutritional deficiency (Heddi et al., 1999, Heddi, 2003). Endosymbionts are housed inside bacteriocyte cells, i.e. specialized cells that isolate them from the humoral and cellular immune responses and ensure their control and strict localization through adapted local immune response and regulation (Anselme et al., 2008, Reynolds and Rolff, 2008).

Endosymbiosis is a dynamic process, and endosymbiont density was shown to vary in many insect models. In aphids, the primary endosymbiont *Buchnera aphidicola* population increases during the first stages of development and then gradually decreases with host senescence (Koga et al., 2003, Sakurai et al., 2005). *B. aphidicola* population is also regulated by nutrient: the bacterial density is positively correlated with nitrogen availability in the insect diet (Wilkinson et al., 2007). In the carpenter ant *Camponotus floridanus*, the primary endosymbiont *Blochmania floridanus* density undergoes drastic changes during the host developmental process, increasing during nymphosis, and decreasing in the adult. This dynamics has been proposed to be the result of an adaptive mechanism allowing the adjustment of the symbiont density according to the varying metabolic needs of the host (Stoll et al., 2010a).

Endosymbiont elimination is tightly regulated, as evidenced in the mealybug *Planococcus*, which harbors two different endosymbionts. In this association, bacteriocytes degenerate during pupation and both endosymbiont populations are eliminated, each with a separate kinetics, highlighting a specificity of the elimination process (Kono et al., 2008). However, while symbiont density dynamics is a well-documented phenomenon, little is known about how this dynamic impacts host developmental processes and adaptive features, and which cellular and immune mechanisms of the host underlie the symbiont fluctuations.

In this work, we aimed at deciphering the cellular and molecular processes involved in the control of endosymbiotic population density. To address this question, we used the association of the cereal weevil, *Sitophilus oryzae*, with the  $\gamma$ -proteobacterium *Sodalis pierantonius* (Heddi et al., 1998, Oakeson et al., 2014). Weevil bacteriocytes are grouped together to form the bacteriome organ, where the endosymbionts are located. In the larval stages, the bacteriome is a C-shaped organ located at the junction between the foregut and the midgut, and undergoes very little change through the larval life of the insect. The larval stages and the pupae take place inside cereal grains, where females lay their eggs. Following metamorphosis, the imago remains inside the grain for three days before emerging. During the first days of imaginal life, numerous bacteriomes differentiate and grow in size at the apex of the midgut mesenteric caeca, and the endosymbiotic population undergoes concomitantly a drastic increase in number (Vigneron et al., 2014). This increase takes place from the first to the sixth day after the Ultimate Insect Molting (UIM), and helps the host to face a critical need in phenylalanine and tyrosine that are required for the adult cuticle synthesis during this phase of insect development (Vigneron et al., 2014). A hard and thick cuticle is an adaptive trait for coleopteran species that grants them a physical protection as well as a barrier against pathogens. Once the cuticle synthesis is over, the nutritional complementation by the endosymbiont becomes less critical for the host. The endosymbiotic population decreases and bacteriocytes are cleared from the gut from the seventh to the fifteenth day after UIM. Endosymbionts are recycled through apoptosis and autophagy. It was speculated that symbiont recycling allows the host to recover part of the energy and nutrients invested during bacterial multiplication and cuticle formation (Vigneron et al., 2014).

To unravel the cellular and molecular processes involved in *S. pierantonius* dynamics, we have performed a Next-Generation Sequencing (NGS) of *S. oryzae* midgut transcriptome during the endosymbiont burst, climax and elimination. We have identified differentially active pathways between these key points of endosymbiont dynamics through a KEGG-based analysis. We then compared the kinetics of expression of representative genes of each pathway between the symbiotic strain and an artificially endosymbiont-depleted strain (aposymbiotic) to highlight transcriptomic regulations that are specifically connected with endosymbiont dynamics. Our results suggest a connection between endosymbiont dynamics and insect development through the Wnt/wingless pathway and hormonal signaling. They also confirm the involvement of autophagy and apoptosis in symbiont recycling and show that these processes are transcriptionally set-up during the symbiotic burst already. Remarkably, this work highlights a clamping of the immune signaling in the midgut while endosymbionts are being digested. We speculate that this immune repression is an adaptive mechanism that allows the host to maximize nutrient recovery from the symbiont digestion by avoiding the release of a resource-expensive immune response that would interfere with endosymbiont digestion.

---

### 3. Material and Methods

#### 3.1 Biological material

*Sitophilus oryzae* weevils are reared on wheat grains at 27.5°C and at 70% relative humidity. The Bouriz strain was chosen in this work because it is free of any facultative symbionts, including *Wolbachia*, and it harbors only *S. pierantonius*. Aposymbiotic insects were obtained as previously described (Nardon, 1973). The aposymbiotic status was confirmed by PCR and histology. Weevil larvae and pupae grow naturally inside the wheat grain.

Insect guts were dissected from fourth instar larvae in Buffer A (25 nM KCl, 10 nM MgCl<sub>2</sub>, 250 nM Sucrose, 35 nM Tris/HCl, pH=7.5). Tissues were pooled and stored at -80°C, prior to RNA extraction.

### 3.2 RNA isolation and libraries construction for RNAseq

RNAseq libraries were constructed from symbiotic insect guts at day 1, day 6 and day 9 after UIM (D1, D6 and D9 respectively). Total RNA from 20 guts was extracted with Trizol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. RNA was incubated with 1 U/ $\mu$ g of RQ1 RNase-free DNase for 30 min, at 37°C then purified with RNeasy micro kit (QIAGEN) clean-up protocol. Two independent replicates of 1  $\mu$ g of RNA sample from D1, D6 and D9 guts were provided to ProfileXpert (Lyon, France) and sequenced on an Illumina HiSeq2000 instrument following the manufacturer's protocol and generate paired-end data (51 bp reads).

### 3.3 Transcriptome assembly and functional annotation

The raw reads were first processed using the ShortRead package (R software) (Morgan et al., 2009). Sequence adapters and homopolymeric reads (with 45 or more of the same base) were removed. Ambiguous and low-quality reads (more than 10 bases with an Illumina quality score  $Q < 20$ ) were also removed. Unpaired-end reads resulting from the previous trimming steps were discarded. Finally, only reads longer than 30 nucleotides were considered for the assembly process. Assembly was performed using Velvet version 1.0.07 (Zerbino and Birney, 2008) and Oases version 0.1.12 (Schulz et al., 2012) software based on de Bruijn graphs using 41 nucleotides as optimal k-mer value. All data from this study have been deposited at the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under BioProject PRJNA284566. *De novo* gene prediction was then performed on assembled transcripts using the Augustus web server (Stanke and Morgenstern, 2005) with *Tribolium castaneum* as training model. Corresponding amino acid sequences were annotated with metabolic information from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) using BlastKOALA (Kanehisa et al., 2012, Kanehisa et al., 2014) to identify involved metabolic pathways. Gene identification parameters and accession numbers can be found in table S2.

### **3.4 Differential gene expression analysis**

To assess changes in gene expression in response to symbiosis, pairwise comparisons have been carried out between D1 and D6, and between D6 and D9. Only loci with a length > 250 nucleotides were considered for this analysis. This filter was shown to improve the correlation between replicates. Differential expression analysis was performed with the R package DESeq (Anders and Huber, 2010) by using a negative binomial distribution model. Dispersion values were estimated with the parameters: method = pooled, sharingMode = fit-only. An adjusted p-value for multiple testing was computed with the Benjamini-Hochberg procedure to control false discovery rate (FDR). Results with a FDR<0.05 were considered statistically significant.

### **3.5 Total RNA extraction and reverse-transcription**

Total RNA from the gut tissue was extracted with the Trizol reagent (Invitrogen). RNA was incubated with 1 U/μg of RQ1 RNase-free DNase for 30 min, at 37°C. The total RNA of guts was extracted using RNAqueous®-Micro (Ambion), which allows for a better RNA yield from small tissue samples. After purification, the RNA concentration was measured with a Nanodrop® spectrophotometer (Thermo Scientific) and RNA quality was checked using agarose gel electrophoresis. Reverse-transcription into the first strand cDNA was carried out using the First Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen).

### **3.6 Real-time RT-qPCR transcript quantification**

The quantification was performed with a LightCycler instrument using the LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). Primers were designed to amplify fragments of approximately 200 bp. A complete list of the primers can be found in TableS1. The PCR reactions were carried out in LightCycler 96-well plates in a final volume of 10 μl, containing 2.5 μl of cDNA samples (diluted fivefold) and 7.5 μl of Light Cycler® 480 SYBR Green Master 1 mix, with 0.5 μl of 10 mM of each primer, 1.5 μl H<sub>2</sub>O and 5 μl of Mastermix. After 5 min, at 95°C, the cycling conditions were as

follows: 45 cycles at 95°C for 10 s, 56°C for 20 s and 72°C for 30 s. Reactions were terminated by a quality control melting curve and a cooling. For each individual sample, the crossing point and the concentration of the gene transcripts were determined. Data were normalized using the ratio of the target cDNA concentration to that of two housekeeping genes: *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gapdh)* and *ribosomal protein L29 (rpL29)*. The plots represent the mean of 5 replicates for each point and error bars represent the standard error calculated as  $\sigma/\sqrt{n}$  where  $\sigma$  is the sample standard deviation and  $n$  the sample size. For statistical analysis, a Generalized Linear Model with Gamma/link inverse transformation has been fitted to the data and analyzed using a two-way ANOVA with Chi-square test. P-values were considered significant if  $<0.05$  for the factors “symbiotic status” and “time”, and if  $<0.10$  for the interaction. All statistical results can be found in Table S3.

### 3.7 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and immunostaining

FISH and immunostaining experiments were performed on dissected symbiotic and aposymbiotic midguts. Midguts were fixed in PBS buffer with 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, cut, and then mounted on poly-lysine coated microscope slides. For FISH experiments, after methylcyclohexan de-waxing and dehydration, sections were covered with a drop of 70% acetic acid for permeabilization. Deproteinization of slides was performed in hydrochlorid acid 0.01 N with pepsin 0.1 mg/ml for 10 min at 37°C. The sections were then pre-hybridized, hybridized with a *S. pierantonius*-specific 5'-end TAMRA-labeled oligo-probe targeting 16S RNA (TAMRA-ACC-CCC-CTC-TAC-GAG-AC-3', 10 µg/mL), washed, and then mounted in PermaFluor™ Aqueous Mounting Medium (ThermoScientific) containing 3 µg/ml of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), as previously described (Balmand et al., 2013). Images were acquired with an epifluorescence microscope (Olympus IX81 equipped with a HQ535/50 filter for green signal, D470/40 for blue signal and HQ610/75 for red signal) and captured using an F-ViewII camera and the CellF software (Soft Imaging System). Images were treated and analyzed using ImageJ (release 1.49).



---

## 4. Results and discussion

### 4.1 RNA sequencing (RNAseq) libraries analysis

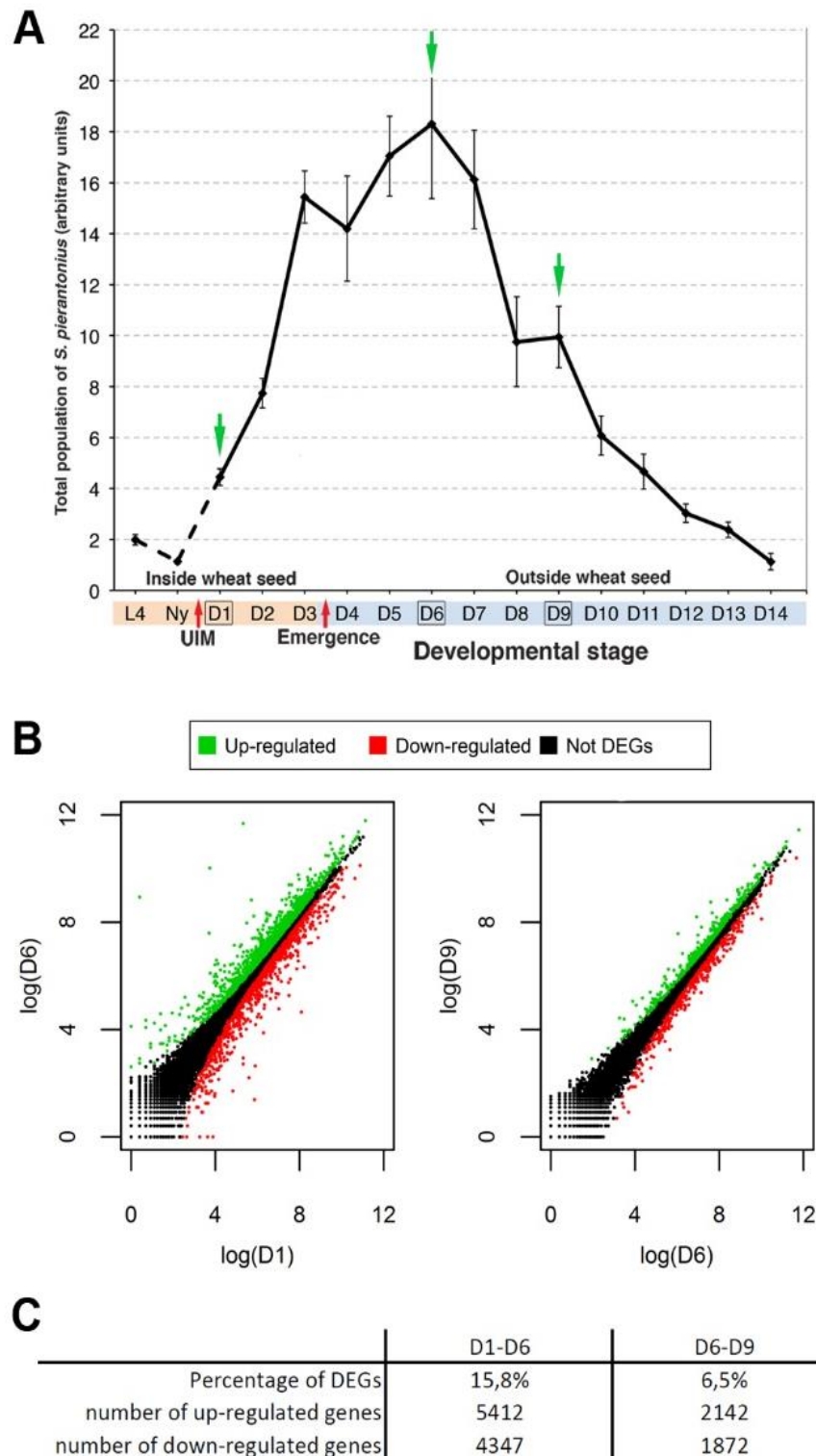
To unravel genes and cellular processes involved in symbiont dynamics, we have constructed six RNAseq libraries from adult weevil midguts at day 1 (D1), day 6 (D6) and day 9 (D9) after the ultimate insect molting (UIM), with two biological replicates per modality. These time points were chosen in accordance with the endosymbiont recycling dynamics previously described by Vigneron *et al.* (2014) (Vigneron et al., 2014). D1 represents a situation where endosymbiont population increases drastically. It then culminates at D6, before being eliminated during the next 8 days. Regarding D6, we assumed that the transcriptomic processes involved in the endosymbionts elimination are already setting up. Similarly, we presumed that the process of elimination is particularly intense between D6 and D9, when most of endosymbionts are eliminated and the insect has achieved its development.

After quality control and trimming of the raw reads, library size ranged from 27 to 48 million reads. Assembly resulted in a midgut reference transcriptome of 61 776 transcripts exceeding 250 bp, of which 56% were identified and annotated. To determine whether the RNAseq replicates were reliable, we performed a correlation analysis based on a linear regression model between both replicates. The regression analysis resulted in an adjusted R-squared of 0.9527 (p-value  $< 2.2 \times 10^{-16}$ ), attesting a high degree of reproducibility. As this was the first time a high-throughput RNAseq experiment was performed on *S. oryzae*, we also compared the RNAseq expression values with experimental qRT-PCR transcript level values for some representative genes (Figure S1; list of tested genes and primers in Table S1). The regression analysis resulted in an adjusted R-squared of 0.8343 (F, 162.1; d.f., 31; p-value =  $7.51 \times 10^{-14}$ ) and showed a high degree of reliability for the RNAseq results.

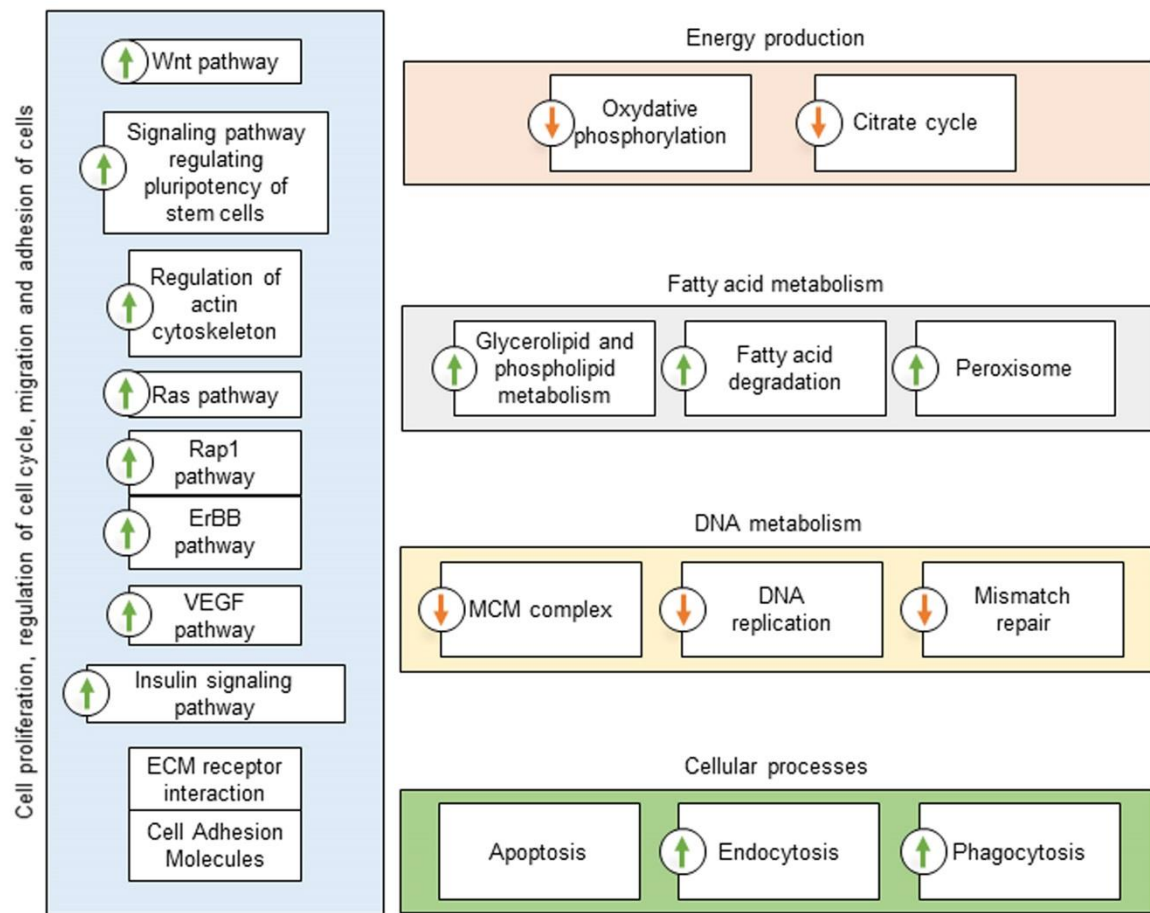
## 4.2 Analysis of differential gene expression and KEGG terms

Pairwise comparisons were performed to identify Differentially Expressed Genes (DEGs) from D1 to D6, and from D6 to D9 (Figure 1). With 5,412 up-regulated and 4,347 down-regulated genes, the D1-D6 comparison yielded the majority of DEGs compared with the D6-D9 comparison that produced 2,142 and 1,872 genes up- and down-regulated, respectively. Such a result highlights that most of the transcriptional changes related to symbiosis and development occur between D1 (symbiont burst) and D6 (utmost endosymbiotic load). The overall D6 transcriptional profile is also much more similar to the D9 than to the D1 profile, indicating that transcriptional regulations driving the endosymbiont elimination are already ongoing at D6, i.e. before symbiont elimination is detectable by q-PCR.

In order to generate a transcriptome annotation allowing the detection of the metabolic and signaling pathways involved in endosymbiont elimination, we have conducted a KEGG-based analysis. Protein sequences corresponding to DEGs in both D1-D6 and D6-D9 comparisons were mapped to the KEGG database. Such an approach allowed identifying a set of 253 different KEGG terms displaying a different activity between the three time points. This list has been manually curated to identify and discard irrelevant terms because of i) their specificity to other taxa (*e.g.* mammalian “Adaptive Immunity” or “Bacterial Secretion Systems”); ii) the low number of associated DEGs; and, iii) the identification of unspecific DEGs such as general signaling key components that are involved in multiple pathways. The manual curation resulted in 21 KEGG terms with a different activity in D1-D6, and only 4 terms in D6-D9. In order to cluster closely related terms, the 21 D1-D6 differential terms have been manually classified into 5 functional categories: *Cell Proliferation and Regulation of Cell Cycle*, *Energy Production*, *Fatty Acid Metabolism*, *DNA Metabolism* and *Other Cellular Processes* (Figure 2). The 4 D6-D9 differential terms are *Ras Pathway*, *Phospholipid Metabolism*, *Phagocytosis* and *Lysosome*.



**Figure 1. Analysis of Differentially Expressed Genes (DEGs) between Day 1, Day 6 and Day 9 after emergence.** (A) qPCR quantification of endosymbiont DNA from 4th instar larvae (L4), late pupae (Ny), and adult males (Dx). Red arrows represent the UIM (Ultimate Insect Molting) and the emergence of the young adult from the wheat grain. Green arrows highlight the time points chosen for the RNAseq analysis. Adapted from Vigneron et al., 2014. (B) DEGs between D1 and D6 and between D6 and D9. The analysis shows a large proportion of transcriptional changes (up- and down-regulations) for the D1-D6 comparison. Red: significantly down-regulated genes; green: significantly up-regulated genes; black: non-differentially expressed genes. (C) Number and proportion of genes that are significantly differentially expressed between D1 and D6 and between D6 and D9.



**Figure 2. Main KEGG terms regrouping DEGs from D1 to D6.**

Are described each KEGG pathway from which at least five sequences are differentially expressed from D1 to D6. Terms were manually grouped into the five functional categories. The arrows indicate whether the pathway is globally overactive or underactive in D6 when compared to D1 (green up arrow: most of the term-attached sequences are up in D6; red down arrow: most of the term-attached sequences are down in D6; no arrow: a similar number of term-attached sequences are up or down in D6, allowing no reliable interpretation about the term activity changes).

The “energy production” KEGG class decreases from D1 to D6, which might be explained by two non-exclusive hypothesizes: the oxidative phosphorylation and citrate cycle are more active in D1 in relation to the high energy demand for developmental processes paralleling symbiont multiplication; the host energy production at D6 decreases as a result of the high energy income from symbiont digestion. As the host starts recycling symbionts through autophagy, energy becomes massively available from bacterial components digestion. The host energy production systems become under-solicited and decrease their

activity. We hypothesize that the “DNA metabolism” KEGG class is linked to the midgut development and bacteriome differentiation at the apex of the mesenteric caeca. This process is reasonably more important at D1, when the midgut is under development, than at D6 when most of the tissues are in place. Along with metabolic changes, most of the differential KEGG terms seem related to development and to cellular mechanisms that are directly involved in the symbiont elimination. Among these processes are notably “apoptosis”, and autophagy, through the KEGG terms “fatty acid degradation”, “peroxisome” and “phagocytosis”, representing the autophagolysosomal degradation of bacterial components. Although these RNAseq data give a global insight on pathways that may be differentially active at different times of the gut development, they do not discriminate between processes involved in symbiont dynamics and processes involved in midgut intrinsic development. To differentiate these two functions, we monitored the transcript levels of genes representative of each pathway in both symbiotic and aposymbiotic insects using qRT-PCR (Figure 3). We chose to focus on the Wnt/wingless pathway, which is one of the most represented developmental pathway in the “Cell Proliferation” KEGG category. The Wnt/wingless pathway is required for a broad range of developmental processes (Murat et al., 2010). The pathway is activated by the recognition of the Wnt ligands by the Frizzled receptors. Its activation leads to the release of  $\beta$ -catenin/Armadillo that binds to the transcription factor Pangolin/TCF, which regulates target gene expression. Nine types of Wnt proteins have been discovered in *Tribolium castaneum*, a coleopteran species closely related to *S. oryzae*; each Wnt impacts differently the insect’s development (Bolognesi et al., 2008). The analysis of *S. oryzae* RNAseq revealed two Wnt coding sequences, *wnt7* and *wnt11* that are differentially expressed along the symbiotic dynamics and between symbiotic and aposymbiotic weevil midgut (Figure 3). *wnt7* transcript steady state level is lower in symbiotic than in aposymbiotic insects from D1 to D9 (p-value = 0.0005), and then reaches similar value from D9 to D11, when symbionts are in the way of a complete elimination. *wnt11* shows an opposite expression pattern, being more highly expressed in symbiotic than aposymbiotic insects (p-value =  $1.10^{-9}$ ). *T. castaneum wnt7*, homologous of *D. melanogaster wnt2*, is involved in tracheal development (Llimargas and Lawrence, 2001), genital disc development (Kozopas et al., 1998) and attachment of flight muscles to the epidermis (Kozopas and Nusse, 2002). *wnt11* function is unknown in

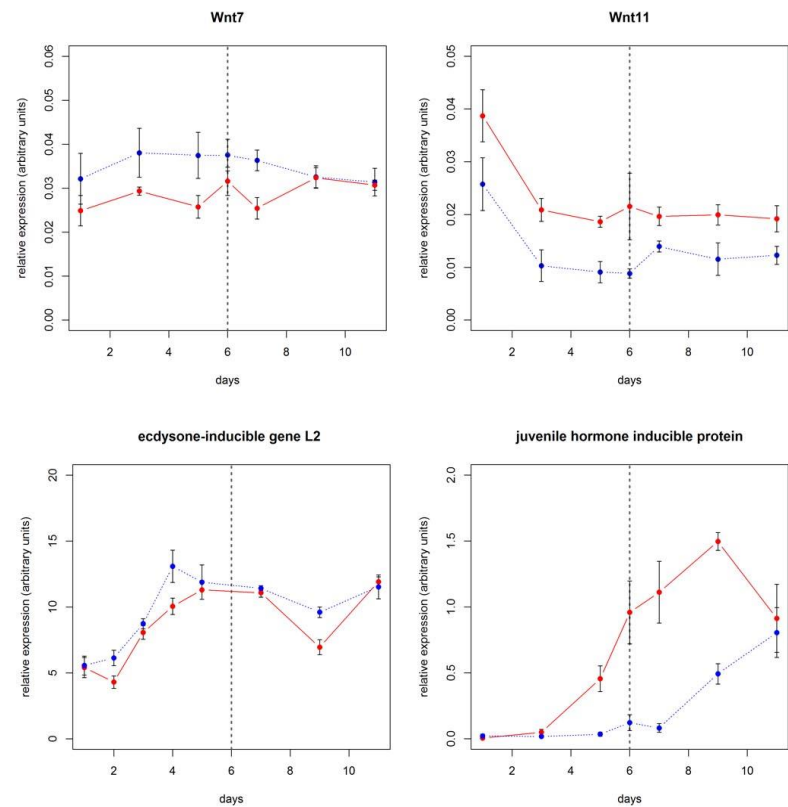
insects. In human, a *wnt11* homologue was shown to be required for progenitor and stem cell development (Xiang et al., 2011, Cohen et al., 2012), and also influences tumoral cells proliferation (Toyama et al., 2010, Dwyer et al., 2010), pointing to a proliferation-regulator function. Although *wnt7* and *wnt11* gene functions have not been investigated in weevils, we hypothesize that they may interact with cell processes paralleling bacteriocyte differentiation and endosymbiont multiplication. These data suggest that the Wnt/wingless pathway may be differentially regulated in symbiotic individuals through the altered expression of Wnt genes.

Hormonal regulation through ecdysone and juvenile hormones is known to be involved in the development of young adults in many insect species, therefore we expected the high throughput analysis to yield DEGs and pathways related to hormonal activity. However, the number of DEGs associated with hormone-related processes was too low to generate a whole KEGG class. To assess the involvement of hormones in development and endosymbiont dynamics, we thus analyzed the expression of genes under the transcriptional control of ecdysone (*ecdysone-inducible gene L2*, EIGL2) and juvenile hormone (*juvenile hormone inducible protein*, JHIP) (Figure 4). Interestingly, EIGL2 expression changes during insect development ( $p\text{-value} = 1.10^{-6}$ ), but its transcript level remains similar between symbiotic and aposymbiotic insects ( $p\text{-value} = 0.07742$ ), suggesting that the symbiotic status does not interfere with ecdysone activity. On the other hand, JHIP expression strongly increases in symbiotic insects from D3 to D9 ( $p\text{-value} < 10^{-16}$ ) while it remains low in aposymbiotic insects. In the latter, the expression of JHIP increases only from D9, showing a delay in their hormonal activity compared to symbiotics. The juvenile hormone has a variety of functions in emerging adults, including imaginal development and reproduction (Riddiford, 2008). This work indicates that juvenile hormone also interacts with endosymbiont dynamics in two possible ways: the symbiotic burst could trigger an increase in juvenile hormone activity through such an unknown mechanism; the juvenile hormone activity may accelerate the symbiotic burst. In both case, the increase in juvenile hormone activity may participate in the accelerated development of symbiotic insects.

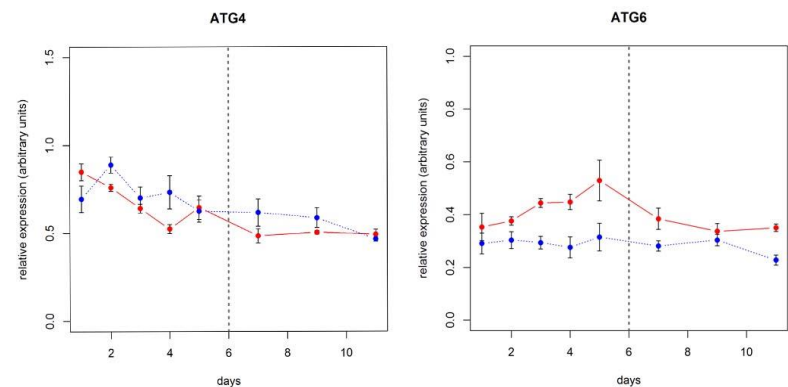
## Development

Figure 3. Kinetics of expression of developmental, apoptosis- and autophagy-related genes identified through the RNAseq analysis.

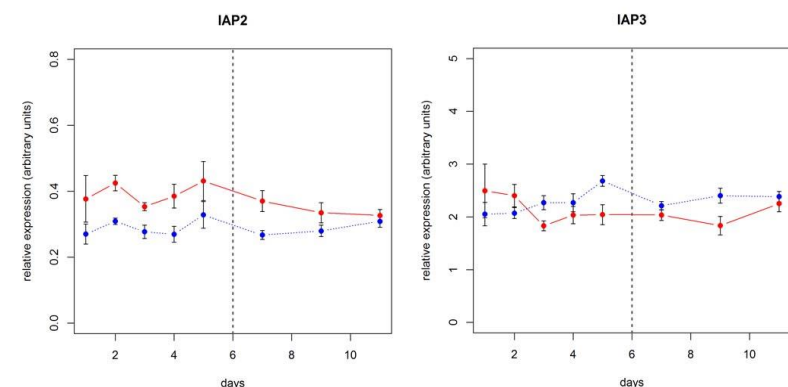
Transcript level quantification has been performed both on symbiotic (red, plain line) and aposymbiotic (blue, dotted line) individuals. Each point represents the mean of five replicates, and the error bars represent the standard errors. The central dotted line on each plot symbolizes D6, when the endosymbiont dynamics switches from a bursting increase to a decrease due to their host-controlled recycling.



## Autophagy



## Apoptosis



### 4.3 Apoptotic and autophagic processes driving symbiont elimination are set-up during the symbiotic burst

It has been shown recently that one-week-old adult weevils recycle endosymbionts through apoptosis and autophagy (Vigneron et al., 2014). Autophagy would allow the insect to redirect to its metabolism the product derivatives from endosymbiont digestion. The RNAseq analysis displayed this process in the D1-D6 differential KEGG pathways dataset. As pointed above, the increased fatty acid metabolism may reflect the digestion of symbiont membranes that were shown to accumulate as lamellar bodies during symbiont recycling (Vigneron et al., 2014). To strengthen these results, we have monitored the expression of AuTophagy-related genes 4 and 6 (ATG4 and ATG6, Figure 3), involved in the regulation of autophagy in *D. melanogaster* (Gorski et al., 2003, Chang et al., 2013, Low et al., 2013). ATG4 showed a slightly increased expression in aposymbiotic insects compared to symbiotics (p-value = 0.01387), but the same expression kinetics in both types of insects (interaction p-value = 0.44290), suggesting no biological function in symbiosis-related autophagy control. ATG6 however showed a higher expression in symbiotic than aposymbiotic insects (p-value =  $6.10^{-13}$ ) (Figure 3). ATG6 expression does not vary upon time in aposymbiotic midguts. In symbiotics, its expression parallels symbiont dynamics, with an increase from D2 to D6 and a decrease from D6 to D11 (p-value symbiotic vs aposymbiotic insects =  $6.10^{-13}$ ). Considering the latency between gene expression and its actual physiological effects, we assume that the expression increase from D2 to D6 is the early transcriptional set-up for the autophagic digestion of symbiont from D6 onward.

We also have monitored the expression of genes encoding Inhibitor of Apoptosis 2 and 3 (IAP2 and IAP3) (Vucic et al., 1997, Hawkins et al., 1998). IAP2 and IAP3 genes have been described previously as strongly expressed in the weevil larval bacteriome under physiological conditions (Vigneron et al., 2012), suggesting their involvement in the bacteriome cellular homeostasis through the inhibition of apoptosis. In the adult midgut, IAP2 is more expressed in symbiotic than in aposymbiotic individuals from D1 to D9 (p-value =  $1.10^{-13}$ ) (Figure 3), suggesting its implication in symbiosis maintenance from D1 to D6, at least. The IAP3 gene does not show any differential expression, neither between symbiotic and aposymbiotic insects (p-value = 0.51013), nor in the



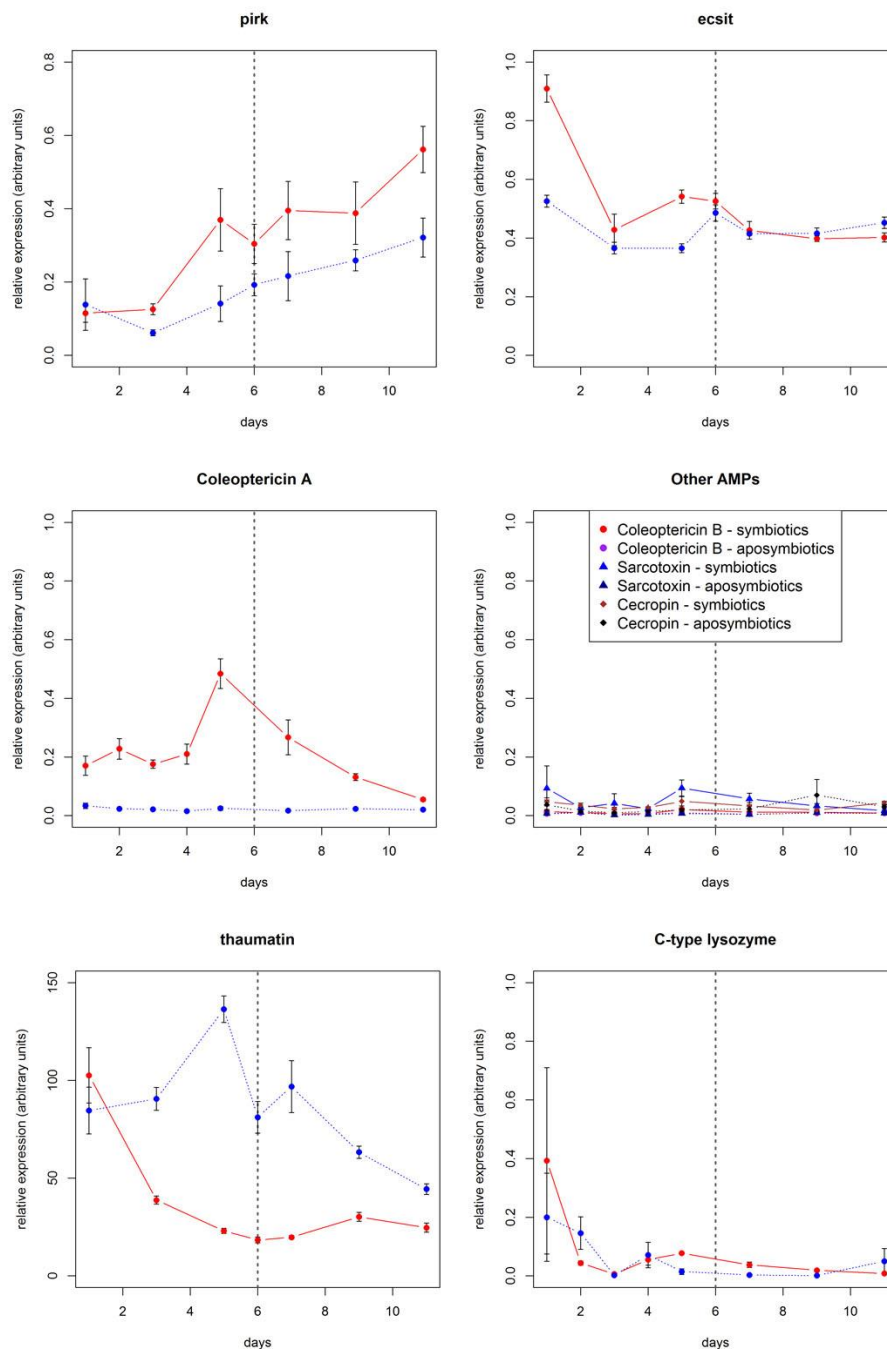
course of time (p-value = 0.14220). At the transcriptional level, autophagy and apoptosis do not seem to be concomitant although they both participate in symbiont recycling. In the coral-dinoflagellates symbiosis, host cells first induces autophagic self-digestion under violent stress conditions, and switches to apoptosis when the stress reaches a certain threshold level (Dunn and Weis, 2009). In *S. oryzae*, the same sequential activation seems to happen, but as a genetic encoded process independent of environmental stress. We propose that autophagy is first triggered and is involved in the recovery of the major part of the symbiont structural components. Then, as the symbiont load becomes very low inside the cells, the triggering of apoptosis leads to the full elimination of the bacteriocytes and recovery of the last nutrient batch from the remaining symbionts, but also from their former housing cells that are no longer required.

#### **4.4 Endosymbionts recycling does not trigger antimicrobial peptide production**

It has been shown that *S. pierantonius*, when artificially injected in the hemolymph of larvae, is recognized as an intruder and triggers the insect humoral immune activation and the production of antimicrobial peptides (AMP) (Anselme et al., 2008). The weevil midgut has also been shown to generate a local immune response upon exposure to exogenous bacteria, leading to the induction of AMP coding genes (Masson et al., 2015). Thus, it has been speculated that the midgut immune response might be triggered following potential bacterial externalization from the bacteriome during endosymbiont dynamics. Surprisingly, very few immune-related genes were identified as differentially expressed along with endosymbiont dynamics in the RNAseq analysis. In the raw differential expression data, the two highest differentials for immune-related genes were *pirk* (*poor imd response upon knock-in* (Kleino et al., 2008), also referred to as PIMS (Lhocine et al., 2008) and Rudra (Aggarwal et al., 2008)) and *ecsit* (*evolutionary conserved intermediate in the Toll pathway*) genes. *pirk* is a negative regulator of the IMD pathway involved in the modulation of the immune response to Gram-negative bacteria and in the tolerance of gut-associated microbiome in *D. melanogaster* (Lhocine et al., 2008, Kleino et al., 2008, Aggarwal et al., 2008). Remarkably, *pirk* transcript level is similar in symbiotic and aposymbiotic midguts at D1, but is significantly increased in symbiotic insects from D3 to D11 when compared to

aprosymbiotic insects (p-value =  $2.10^{-6}$ ; Figure 4). *ecsit* is a signal transduction protein, involved in the Toll-like Receptor (TLR) pathway in vertebrates and Toll pathway in *D. melanogaster* (Kopp et al., 1999, Akira and Takeda, 2004). Its transcript level was higher in symbiotic than in aposymbiotic midguts from D1 to D5 (p-value  $<10^{-16}$ ), then decreased to reach a similar level (Figure 4). This down-regulation of an immune signaling intermediate (*i.e.* *ecsit*) paired with the up-regulation of a negative immune regulator (*i.e.* *pirk*), points to a global decrease of the midgut immune signaling and presumably to a negative control on AMP production. To strengthen this finding, we have monitored by qRT-PCR the expression of AMP coding genes, which were not detected in the high throughput analysis. We have analyzed the expression of four AMP coding genes, namely *coleoptericin A*, *coleoptericin B*, *sarcotoxin* and *cecropin*. Coleoptericin A was shown to target weevil endosymbionts and to limit their infection to the bacteriome organ, by inhibiting bacterial cell divisions (Login et al., 2011). The transcription of the three other AMP-encoding genes is strongly up-regulated following insect infections with pathogens (Anselme et al., 2008, Login et al., 2011, Vigneron et al., 2012, Masson et al., 2015). In this study, *coleoptericin B*, *sarcotoxin* and *cecropin* showed no significant expression changes with time, remaining at the basal expression level in both symbiotic and aposymbiotic midguts (respective p-values for *coleoptericin B*, *sarcotoxin* and *cecropin* are 0.9293; 0.1616; 0.3622; Figure 4).

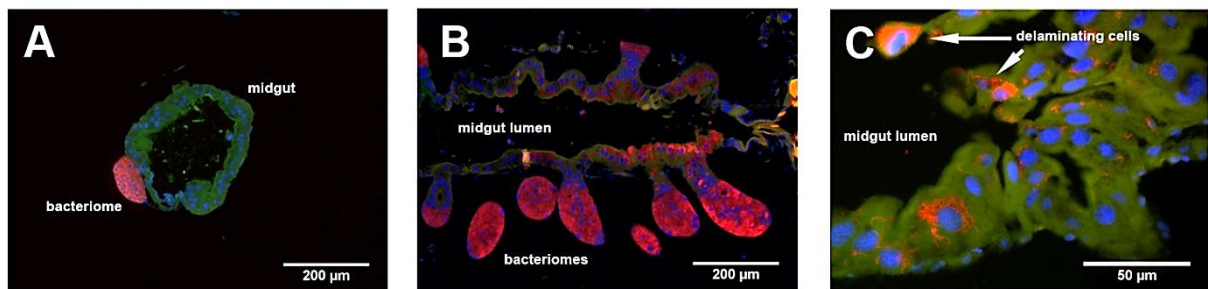
# Immunity



**Figure 4. Expression of immune-related genes in symbiotic and aposymbiotic individuals.** Transcript level quantifications have been performed both on symbiotic (red, plain line) and aposymbiotic (blue, dotted line) midguts. Each point represents the mean of five replicates, and the error bars represent the standard errors. The central dotted line on each plot symbolizes D6, when the endosymbiont dynamics switches from a bursting increase to a decrease due to their host-controlled recycling.

Remarkably, however, the expression profile of the *coleoptericin A* in symbiotic midguts parallels endosymbiont dynamics, with an increase from D1 to D6 and a decrease from D6 to D11 (p-value = 0.04327; Figure 4). In addition, the *coleoptericin A* expression is not detected in midguts isolated from aposymbiotic individuals, suggesting the specificity of this AMP function with regards to symbiont control and maintenance.

In addition to these well-described AMP, we found one differentially expressed sequence in the D1-D6 dataset that matches a *thaumatin-like* gene. A *thaumatin* sequence was identified earlier in *S. oryzae* but has never been functionally studied (Anselme et al., 2008). Thaumatinins were described as anti-fungal proteins with a glucanase function (Brandazza et al., 2004), although their precise mechanism of action is still unknown. In the soybean, a Thaumatin-like protein encoding gene is constitutively expressed in root nodules, allowing the plant to tolerate some strains of nitrogen-fixating symbionts (Hayashi et al., 2014). The Thaumatin prevents bacteria from other strains to invade the host epidermal cells and to settle in the root nodule. In *S. oryzae*, *thaumatin* is highly expressed at D1 in both symbiotic and aposymbiotic midguts, but its expression drastically decreases in symbiotics during the symbiont population burst from D1 to D6, and remains low from D6 to D11 (Figure 4). In aposymbiotic individuals, *thaumatin* expression is high and stable until D6, and decreases afterwards. We speculate that *thaumatin* down-regulation might prevent damaging the endosymbionts as their population increases. In combination with *pirk* and *ecsit* expression profiles, these results show that not only the gut immune response remains down-regulated during the whole endosymbiont dynamics changes, but also strongly suggest that immune regulators actively clamp AMP production. Taken together, these findings indicate that endosymbiont elimination and recycling is not preceded by AMP-mediated bacterial lysis, but rather relies on autophagy and apoptosis only. These cellular processes, by maintaining symbionts intracellularly, likely prevent inflammation and the release of microbe-associated molecular patterns in the hemolymph.



**Figure 5.** (A) Larval bacteriome showing *S. pierantonius* (red) secluded inside bacteriocytes. (B) Overview of an adult midgut showing *S. pierantonius* in bacteriocytes, enterocytes and delaminating cells. (C) Delaminating enterocytes in an adult weevil midgut, showing *S. pierantonius* in their cytosol.

To check whether these mechanisms did efficiently maintain endosymbiont intracellular localization, we conducted Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) experiments on larval and adult stages. In larval stages, endosymbionts remain strictly isolated within the bacteriome and no bacterium could be seen elsewhere, including in the gut epithelium (Figure 5A). In D1, D6 and D9 adults, however, many endosymbionts were seen in other cells than bacteriocytes, and with a high density in several gut epithelial cells. Importantly, endosymbionts were never seen extracellularly (Figure 5C). Delamination of epithelial cells into the gut lumen was also observed, including for symbiont-containing epithelial cells (Figure 5C). Delamination and renewal of epithelial cells is a system of protection of the midgut integrity when facing bacterial infection or damages (Buchon et al., 2010). These observations suggest that delamination and likely epithelial renewal may be involved in the restructuration of the midgut along with the process of symbiont elimination by apoptosis and autophagy. Further analysis will be needed to address whether midgut epithelium delamination is associated with an increased cell renewal and whether it involves the Wnt/wingless pathway differential activity that has been highlighted in the KEGG analysis.

---

## 5. Conclusion

This work provides new insights onto mechanisms involved in insect endosymbiont dynamics and control. The transcriptomic approach showed that weevil endosymbiont dynamics affects a broad range of cellular processes and pathways, including developmental pathways and metabolism of fatty acids and DNA. Genes involved in autophagy and apoptosis pathways are also activated before these cellular processes are detectable with PCR and histology. We also have demonstrated that the whole endosymbiont recycling process remains intracellular within the bacteriocytes and the midgut epithelium. Epithelial cells that contain endosymbionts undergo delamination, and are likely replaced through an increased enterocytes renewal. Altogether these mechanisms prevent endosymbiont externalization from the bacteriocyte and epithelial cells and avoid immune activation and tissue inflammation. The host immunity pathways involved in AMP production remain clamped during the whole process, as attested by the low transcript levels of genes encoding AMP and the over-expression of negative immune regulators such as *pirk*. This regulation may allow the host to avoid a resource-expensive immune response that would clutter endosymbiont digestion, thus maximizing the nutrient recovery. *cola* gene transcript level exhibits a different profile than the other AMP, increasing in parallel with endosymbiont charge. Taken together, these findings provide evidence that insect endosymbiont regulation involves at least two main mechanisms: a first one that operates within the bacteriocytes and control symbiont cell division through “symbiosis-adapted” AMP (*e.g. cola* gene) (Login et al., 2011), and a second one involving basic cellular processes, such as autophagy and apoptosis, that allow insects to control the symbiont charge in accordance to their physiological needs.

---

## 6. Acknowledgements

This work was supported by INRA, INSA-Lyon, and the French ANR-10 BSV7-170101-03 (ImmunSymbArt) and ANR-13-BSV7-0016-01 (IMetSym). qRT-PCR was carried out in the DTAMB (Développement de Techniques et Analyse Moléculaire de la Biodiversité, University of Lyon). We would like to thank Emre Aksoy for the critical review of the manuscript.

### 3. Principaux résultats et conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux changements de régulations génétiques qui accompagnent le passage de la symbiose de *S. oryzae* d'un état stable (stade larvaire) à un état marqué par une très forte dynamique des endosymbiotes (jeune imago). Une approche transcriptomique à haut débit a mis en évidence de forts différentiels d'expression dans l'intestin d'individus symbiotiques entre J1, le premier jour de l'augmentation du nombre de symbiotes, et J6, le jour où ils atteignent leur densité maximale dans les bactériomes. Les gènes présentant un différentiel d'expression entre ces deux points ont été rattachés à des voies de signalisation ou à des processus cellulaires grâce à une approche basée sur la reconnaissance d'orthologies avec les séquences de la base de données KEGG. La corrélation entre la dynamique symbiotique et les changements d'activité des voies et processus mis en évidence par l'analyse KEGG a été confirmée par une mesure de la cinétique d'expression de gènes représentatifs de chaque voie par RTqPCR, en comparant le profil obtenu dans des intestins d'insectes symbiotiques de J1 à J15 à celui obtenu dans des intestins d'insectes aposymbiotiques.

L'analyse a mis en évidence l'induction de l'effecteur autophagique *atg6* de J1 à J6, ainsi que la répression du gène anti-apoptotique *iap2*, montrant la mise en place au niveau transcriptionnel de l'apoptose et de l'autophagie pendant l'augmentation du nombre de symbiotes, renforçant ainsi les données d'imagerie obtenues par Vigneron et al. (2014).

L'analyse a également mis en évidence une activité importante de la voie de signalisation Wnt/wingless, impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire chez de nombreux modèles (Murat et al., 2010). La mesure de la cinétique d'expression de *wnt7* et *wnt11*, deux gènes de la famille Wnt/wingless, montre que ces derniers ont une cinétique différente entre individus symbiotiques et aposymbiotiques. La voie Wnt/wingless pourrait ainsi être impliquée dans la différenciation des bactériocytes dans les caeca mésentériques. Un fort différentiel d'expression entre J1 et J6 a également été observé sur un gène codant une protéine inconnue, JHIP, pour laquelle l'analyse bio-informatique prédit une régulation transcriptionnelle par l'hormone juvénile. L'expression du gène *jhip* est donc considérée comme un système de mesure indirecte de l'activité de l'hormone juvénile. L'analyse de

l'expression de ce gène par RT-qPCR chez des individus symbiotiques et aposymbiotiques a révélé qu'elle augmentait très fortement à partir de J3 chez les individus symbiotiques. Cette augmentation est retrouvée chez les individus aposymbiotiques, mais elle intervient beaucoup plus tard dans leur développement, à J7. L'hormone juvénile intervient dans plusieurs processus chez les insectes, et notamment dans la maturation sexuelle des jeunes adultes (Riddiford, 2008). Elle pourrait interagir avec la dynamique symbiotique de deux façons : une augmentation du signal hormonal pourrait être induite par la prolifération symbiotique, *via* une signalisation encore inconnue ; ou bien l'accroissement du signal hormonal pourrait accélérer l'augmentation du nombre de symbiotes. Que l'hormone juvénile soit une cause ou une conséquence de la dynamique symbiotique, elle pourrait être en partie responsable de la maturation sexuelle accélérée des individus symbiotiques par rapport aux aposymbiotiques, observée au laboratoire (données non publiées). Cette hormone serait ainsi un acteur dans la synchronisation de la dynamique endosymbiotique avec la physiologie de l'hôte.

Curieusement, aucune voie immunitaire régulant la synthèse de PAMs n'a été relevée par l'analyse KEGG, suggérant que les PAMs sont peu ou pas impliqués dans la régulation de la dynamique symbiotique chez l'adulte, pendant cette phase de synthèse cuticulaire. L'analyse de la cinétique d'expression de gènes liés à l'immunité par RT-qPCR a montré que les gènes codant des PAMs n'étaient pas exprimés dans l'intestin, à l'exception de *colA* dont la cinétique d'expression de J1 à J15 est directement corrélée à l'évolution de la charge symbiotique. L'absence d'expression des gènes codant les PAMs pourrait être due en partie à l'induction d'un régulateur négatif de l'immunité, le gène *pirk* (Lhocine et al., 2008), ainsi qu'à une diminution de l'expression de gènes codant pour des intermédiaires de signalisation, comme *ecsit* (Kopp et al., 1999). La localisation des symbiotes par imagerie FISH a montré que leur élimination était strictement intracellulaire tout au long du processus. Le maintien intracellulaire du processus empêcherait l'élicitation de la réponse immunitaire humorale et de l'inflammation. L'induction de régulateurs immunitaires négatifs pour en assurer la répression serait ainsi un mécanisme complémentaire permettant à l'insecte d'éviter le déclenchement d'une réponse immunitaire coûteuse en énergie.



# *DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES*

Un nombre grandissant d'équipes de recherche s'intéressent à l'étude des mécanismes permettant aux eucaryotes multicellulaires de contrôler la localisation et la densité de leurs partenaires symbiotiques (Batut et al., 2011, Davy et al., 2012, Login and Heddi, 2013, Kostic et al., 2013, McFall-Ngai, 2014). Chez de nombreux insectes hébergeant des bactéries mutualistes intracellulaires, la densité de population de ces dernières varie au cours de la vie de l'hôte : elle augmente au cours du développement larvaire et au début du stade imaginal, puis diminue progressivement avec la sénescence de l'individu (Koga et al., 2003, Sakurai et al., 2005, Kono et al., 2008, Stoll et al., 2010a). Une des particularités du modèle d'étude *S. oryzae* est de présenter des caractéristiques symbiotiques différentes à l'état larvaire et à l'état adulte. L'état larvaire est caractérisé par une symbiose relativement stable. La localisation du bactériome est fixe, et la charge endosymbiotique n'augmente que faiblement au cours du développement larvaire. Cette faible dynamique symbiotique est associée à une homéostasie cellulaire. J'ai ainsi pu approcher les mécanismes immunitaires impliqués dans la tolérance des endosymbiotes et leur maintien à l'intérieur des bactériocytes. Le passage des charançons au stade imaginal est marqué par une restructuration de l'organisation symbiotique au niveau tissulaire, une augmentation drastique de la charge symbiotique pendant les premiers jours adultes, suivie par une élimination rapide des endosymbiotes (Vigneron et al., 2014). Cette dynamique symbiotique contrastée chez l'adulte a permis d'investiguer la façon dont la symbiose est intégrée à la physiologie de l'hôte, ainsi que les processus moléculaires qui gouvernent l'ajustement de la charge symbiotique aux besoins physiologiques et développementaux de l'insecte.

## **1. L'expression des gènes codant *coA* et les autres PAMs fait intervenir des mécanismes de régulation originaux et complexes**

Les travaux récents de notre équipe ont montré que le bactériome larvaire des charançons est immuno-réactif, et qu'il exprime une réponse immunitaire modulée en présence des endosymbiotes (Anselme et al., 2008, Vigneron et al., 2012). En plus de cette réponse dirigée contre les endosymbiotes, qualifiée de réponse « interne » le bactériome est aussi capable de générer une réponse immunitaire « externe », inductible en cas d'infection bactérienne de son hôte (Masson et al., 2015). La réponse interne serait impliquée dans la tolérance intracellulaire et le contrôle des endosymbiotes, alors que la réponse externe

interviendrait dans la protection des endosymbiotes contre d'éventuelles invasions de l'insecte par des bactéries libres. Cette dualité interroge sur la façon dont le bactériome génère et régule ces deux formes de réponse.

Parmi les gènes fortement exprimés dans le bactériome par rapport aux autres tissus de la larve se trouvent plusieurs gènes immunitaires, comme *wpgpr1*, *ecsit*, *tollip*, *imd* ou encore *relish* (Anselme et al., 2008, Vigneron et al., 2012, Masson et al., 2015), ainsi que le gène *colA*, impliqué dans le confinement intracellulaire des endosymbiotes. En dépit de la forte activité transcriptionnelle de ces gènes et de la présence d'une charge bactérienne importante dans le bactériome, les gènes codants d'autres PAMs sont peu ou pas exprimés dans cet organe en conditions physiologiques. Cette situation soulève deux questions : i- celle du contrôle des endosymbiotes *via* la production de ColA, et ii- celle de la tolérance des endosymbiotes *via* l'inhibition de l'expression des gènes codants les autres PAMs.

Dans d'autres systèmes, différents mécanismes participant à la tolérance envers des bactéries symbiotiques ont été mis en évidence. Dans le cas du microbiote intestinal des vertébrés et des invertébrés, un de ces mécanismes est l'isolement physique de l'épithélium, qui limite les interactions entre les bactéries et les tissus potentiellement immunoréactifs de leur hôte. Chez les mammifères, cet isolement est médié par la sécrétion de mucus et de la lectine RegIII $\gamma$ , qui assure le maintien d'une zone d'environ 50  $\mu$ m entre les bactéries mutualistes et les cellules épithéliales (Vaishnava et al., 2011). La perte de fonction du gène *regIII $\gamma$*  entraîne la colonisation de l'épithélium par le microbiote et le déclenchement d'une réponse immunitaire, y compris adaptative, contre ces derniers. Chez de nombreux insectes, l'isolement du microbiote est assuré mécaniquement par la membrane péritrophique, une matrice chitinisée qui forme un tube poreux dans la lumière intestinale, laissant passer les nutriments vers les entérocytes, mais bloquant les bactéries (Buchon et al., 2013, Engel and Moran, 2013). Des régulateurs moléculaires viennent compléter la tolérance envers les bactéries mutualistes en assurant une réponse immunitaire modérée contre ces dernières. Chez la drosophile, ces régulateurs comptent PGRP-LB et PGRP-LF (voir Introduction), mais aussi *pirk/PIMS*, qui cause l'internalisation du récepteur PRPG-LC et bloque ainsi l'activation de la voie IMD (Lhocine et al., 2008, Kleino et al., 2008, Aggarwal et al., 2008), ainsi que le gène homéotique *caudal*, qui réprime l'expression NF- $\kappa$ B-dépendante des gènes codants les PAMs dans l'intestin (Ryu et al., 2008). La situation de *S. oryzae* est

cependant différente sur plusieurs points. La localisation de *S. pierantonius*, libre dans le cytoplasme des bactériocytes, implique nécessairement un contact avec ces derniers. De plus, *pirk* et *caudal* montrent une expression respectivement deux fois et trois fois plus faible dans le bactériome que dans les autres tissus larvaires (Masson et al., 2015, et données non publiées), suggérant que ces deux régulateurs potentiels n'interviennent que peu au niveau du bactériome, et que les régulations génétiques observées au niveau de l'intestin de la drosophile ne sont pas directement transposables aux endosymbioses intracellulaires.

Afin de mieux comprendre la régulation différentielle entre *colA* et les autres gènes codant les PAMs, j'ai procédé à l'inhibition par iARN des gènes de la réponse immunitaire qui sont surexprimés dans le bactériome, et qui pourraient avoir un rôle régulateur dans l'expression des voies immunitaires. J'ai ainsi montré que l'expression du gène *colA* n'est pas affectée par l'inhibition du gène *relish*. Elle est en revanche fortement réduite lorsque les gènes *relish* et *tollip* sont inhibés simultanément. Ceci suggère l'existence d'un mode de régulation différent des mécanismes immunitaires NF- $\kappa$ B-dépendants canoniques de la drosophile. Des mécanismes de régulation indépendants de la voie IMD ont déjà été décrits dans la réponse immunitaire locale des glandes salivaires et de la spermathèque de la drosophile, où le gène codant la Drosomycine est exprimé de façon constitutive même chez des mutants déficients pour *imd* (Tzou et al., 2000). Le bactériome de *Sitophilus* montre en revanche une intrigante capacité à produire une réponse de ce type, mais aussi une réponse *relish*-dépendante inductible en cas d'infection, sans que l'une ne semble interférer avec l'autre. Chez les vertébrés, les homologues de *tollip* et *relish* sont situés respectivement en amont et en aval de la voie des TLR (Burns et al., 2000, Silverman et al., 2000, Rutschmann et al., 2000, Zhang and Ghosh, 2002). La dépendance de l'expression de *colA* envers l'expression simultanée de ces deux gènes suggère un mode de régulation qui ferait intervenir de nombreux intermédiaires, potentiellement à travers plusieurs voies de signalisation distinctes. Le mécanisme de régulation précis de *colA* nécessitera une étude fonctionnelle plus approfondie afin de déterminer les intermédiaires de signalisation impliqués. De même, il reste encore à comprendre comment est assurée la liaison entre la perception de la population bactérienne et l'activation de cette signalisation. En effet, la coordination du taux d'expression de *colA* avec la charge symbiotique observée chez les jeunes adultes du charançon (voir

chapitre 3) argue en faveur d'une régulation symbiote-dépendante de *colA*. Le signal pourrait être d'origine bactérienne, par exemple une accumulation de MAMPs de *S. pierantonius*. Ces MAMPs seraient reconnus par des récepteurs spécifiques, qui n'induirait que *colA*, indépendamment des autres PAMs. Le signal pourrait également être indirect, consistant par exemple en une accumulation d'intermédiaires métaboliques qui, grâce à l'intrication des signalisations métaboliques et immunitaires, régulerait l'expression de *colA* sans affecter celle des autres PAMs.

Outre la régulation du gène *colA*, un des aspects les plus intrigants de la réponse interne est l'absence d'induction des gènes codants les autres PAMs dans le bactériome en dépit de la présence massive de *S. pierantonius*. L'inhibition de l'expression de *relish* cause certes une diminution détectable de l'expression du gène *colB*, suggérant qu'en conditions standards ce gène est exprimé de façon *relish*-dépendante à un niveau non négligeable. Cependant, ce niveau d'expression reste extrêmement faible au regard de la forte présence bactérienne, et aucun mécanisme expliquant cette faible expression n'a été démontré à ce jour. L'annotation du génome de *S. oryzae*, qui est en cours de réalisation en collaboration avec l'Université de Valence, aidera à déterminer les séquences régulatrices et les promoteurs en amont des séquences codantes de *colA* et des autres PAMs, et mettra peut-être en évidence des mécanismes génétiques inattendus. Enfin, une des limites de ce travail sur la réponse interne du bactériome est qu'il s'appuie uniquement sur des données transcriptomiques. Plusieurs mécanismes de régulation des signalisations immunitaires chez la drosophile interviennent au niveau post-transcriptionnel, comme l'ubiquitination de la caspase DREDD et le clivage activateur de Relish (Leulier et al., 2000, Meinander et al., 2012). Ainsi, une partie seulement des régulations a pu être approchée dans cette étude, soulignant la nécessité de développer de nouveaux outils techniques chez *S. oryzae* pour étendre les recherches au niveau protéique.

Outre des mécanismes de régulations génétiques ou post-transcriptionnels, l'absence d'expression des gènes codant les PAMs pourrait aussi être la conséquence d'une répression épigénétique. La méthylation de l'ADN, en particulier des cytosines, est un mécanisme épigénétique de régulation de l'expression génique très conservé chez de nombreux modèles vertébrés et invertébrés (Bird and Taggart, 1980, Li et al., 1993, Robinson et al., 2011). Il

est décrit chez plusieurs insectes dont le coléoptère *T. castaneum* (Lyko et al., 2000, Kucharski et al., 2008, Walsh et al., 2010, Feliciello et al., 2013), mais le taux de méthylation des génomes insectes est faible comparé à celui observé chez les mammifères, suggérant un impact moins important sur l'expression des gènes à l'échelle du génome (Bird and Taggart, 1980, Robinson et al., 2011). Un autre mécanisme épigénétique pouvant intervenir sur l'expression génique est la modification de l'histone 3 (H3), qui peut être méthylée jusqu'à trois fois sur un résidu lysine. Chez l'homme, une mono-méthylation sur H3 est associée à une activation de l'expression génique, tandis qu'une di- ou tri-méthylation est associée à une répression (Barski et al., 2007). Ce schéma de régulation via la méthylation de H3 a été retrouvé chez la drosophile ainsi que chez les cochenilles (Bongiorni et al., 2009, Eissenberg and Reuter, 2009), suggérant un haut niveau de conservation, et donc la possibilité qu'un mécanisme similaire puisse agir sur le génome de *S. oryzae*. Des travaux d'immunoprécipitation de la chromatine sont actuellement en cours au laboratoire pour déterminer le degré de méthylation des histones H3 associées aux gènes codant les PAMs, et les résultats préliminaires semblent prometteurs. Les endosymbioses obligatoires impliquent vraisemblablement un dialogue actif de la part des deux partenaires, il n'est donc pas exclu que des régulations épigénétiques puissent également intervenir du côté bactérien. La méthylation de l'ADN a été identifiée chez *Streptococcus mutans* et *Salmonella typhimurium* comme un mécanisme permettant l'extinction de l'expression de gènes codant pour des composants de membrane ou des facteurs de virulence (Banas et al., 2011, Sarnacki et al., 2013). Chez la bactérie pathogène *Haemophilus influenzae*, des gènes codant des ADN-méthyltransférases sont sujets à des changements rapides de phase ouverte de lecture par insertion/délétion de microsatellites sur les séquences régulatrices. Ces dernières méthylent l'ADN de nombreux gènes de façon séquence-spécifique, et modulant ainsi la synthèse de protéines immunogènes. Le blocage de leur synthèse est à l'origine d'une évasion immunitaire de la bactérie lorsqu'elle infecte l'Homme (Atack et al., 2015). Ce type de régulation, très rapide, pourrait expliquer pourquoi *S. pierantonius* n'élucite pas l'expression des gènes codant les PAMs dans le bactériome, mais les élucite de façon systémique lorsqu'elle est injectée dans l'hémolymphe de la larve (Anselme et al., 2008). Un tel mécanisme aurait aussi pu intervenir aux origines évolutives de l'interaction symbiotique, aux stades précoces de l'endosymbiogenèse, en

permettant la tolérance immunitaire de l'hôte envers des bactéries dont le génome code pour des composés de paroi et des facteurs de virulence immunogènes.

## **2. La dynamique symbiotique contrastée chez les jeunes adultes atteste de l'intégration de l'endosymbiose à la physiologie de l'hôte**

Comme chez la larve, les gènes codant les PAMs apparaissent très faiblement exprimés dans les bactériomes des jeunes adultes, en dépit d'une forte croissance de la charge symbiotique. Outre ce 'bridage' de l'immunité, les analyses menées chez l'adulte ont suggéré une différence d'activité hormonale entre les insectes symbiotiques et aposymbiotiques. L'expression de *jhip*, un gène qui serait régulé par l'hormone juvénile, est induite de façon corrélée à l'accroissement du nombre de symbiotes. Chez l'insecte adulte, l'hormone juvénile intervient essentiellement dans les processus de maturation sexuelle (Riddiford, 2008). Le décalage entre l'induction du gène *jhip*, à J3 pour les symbiotiques et J7 pour les aposymbiotiques, suggère une activité de l'hormone juvénile plus précoce en conditions symbiotiques. Ce résultat renforce des données non publiées du laboratoire montrant que les femelles symbiotiques produisent des œufs plus gros que les aposymbiotiques à âge égal. Elles sont aussi fertiles plusieurs jours avant les femelles aposymbiotiques. Le lien entre symbiose, métabolisme et développement a été rapporté par plusieurs auteurs chez *S. oryzae* (Nardon and Wicker, 1981, Heddi et al., 1993, Grenier et al., 1994) mais c'est la première fois qu'un lien est établi entre le système endocrinien et la synchronisation de la physiologie de l'hôte avec son état symbiotique. Les travaux futurs nous diront si l'augmentation de l'activité endocrinienne est une cause ou une conséquence de l'accroissement du nombre de symbiotes. Sachant que l'induction de *jhip* commence trois jours après le début de la phase d'accroissement symbiotique, il est plus probable que cette dernière soit le signal qui déclenche la signalisation hormonale. Dans ce cas, il serait intéressant de comprendre comment ce signal est intégré, un travail qui ouvrira de nouvelles perspectives dans la compréhension de la communication moléculaire entre les endosymbiotes et leur hôte.

Enfin, continuer les investigations sur le stade adulte pourrait aussi permettre une meilleure compréhension de la fonction de certains gènes fortement exprimés dans le bactériome larvaire, mais dont le rôle vis-à-vis de la symbiose

demeure inconnu. C'est l'exemple des gènes *fk506bp* et *megwb*, qui sont les gènes les plus exprimés dans le bactériome larvaire (Vigneron et al., 2012). Une très forte expression implique un investissement énergétique important, suggérant une fonction importante des protéines correspondantes. Pourtant, l'inhibition des transcrits de ces deux gènes par iARN n'a révélé chez la larve aucun phénotype remarquable sur la morphologie du bactériome et des symbiotes, ni sur l'expression des gènes codant des PAMs. L'absence de détection d'un phénotype au stade larvaire n'exclut bien sûr pas une fonction à ce stade, mais il est également possible que les protéines codées par ces gènes soient produites au stade larvaire en prévision d'une fonction importante en début de vie imaginaire, pendant la dynamique symbiotique.

Enfin, bien que l'intégration de l'endosymbiose à la physiologie et au développement de l'hôte ait maintenant été largement étudiée aux stades larvaire et adulte, de nombreuses questions subsistent encore concernant l'acquisition des endosymbiotes au stade embryonnaire, ainsi que leur contrôle lors de la restructuration tissulaire massive de l'hôte lors de la métamorphose. Des auteurs ont décrit très tôt l'héritage des endosymbiotes primaires du puceron du pois *A. pisum* (Uichanco, 1924, Buchner, 1965, Miura et al., 2003). Il n'existe cependant aucune donnée sur les mécanismes moléculaires assurant ce transfert chez les modèles endosymbiotiques, ni sur la pénétration des endosymbiotes dans le milieu intracellulaire. Chez la drosophile, le symbiote facultatif *Spiroplasma poulsonii* colonise la lignée germinale par co-option avec la machinerie cellulaire responsable de la synthèse et de l'intégration du vitellus aux œufs (Herren et al., 2013). Un tel mécanisme pourrait également être utilisé par des endosymbiotes primaires. Chez *A. pisum*, lors du développement embryonnaire, les bactériocytes se différencient même en absence des endosymbiotes, suggérant que ces derniers ne participent pas au programme de différenciation des cellules de l'hôte (Braendle et al., 2003). Chez *S. oryzae* cependant, les souches aposymbiotiques créées en conditions de laboratoire ne développent pas de bactériome, suggérant que la colonisation des futurs bactériocytes à l'état embryonnaire et la différenciation de ces derniers dépendent largement de facteurs bactériens. Un tel impact de symbiotes sur le développement de leur hôte a déjà été observé chez la seiche *Euprymna scolopes*, dont le développement de certains epithelia est conditionné par la présence du symbiote secondaire *Vibrio fischeri* (McFall-



Ngai and Ruby, 1991, McFall-Ngai, 2014). Investiguer les mécanismes d'établissement de la symbiose au stade embryonnaire chez *S. oryzae* permettrait de mieux comprendre le rôle des endosymbiotes dans ce processus. La métamorphose est également un stade qui soulève de nombreuses questions quant au maintien de l'endosymbiose. Lors de cette étape de leur développement, les insectes holométaboles restructurent très largement l'ensemble de leurs tissus (Gullan and Cranston, 2005). Ces restructurations peuvent avoir un impact radical sur les populations microbiennes hébergées par l'hôte. Les cas les plus marquants sont ceux des moustiques des genres *Aedes*, *Culex* et *Anopheles*, dont la flore intestinale larvaire est totalement éliminée lors de la métamorphose, le jeune imago devant acquérir une nouvelle flore à partir de son environnement (Moll et al., 2001). A l'heure actuelle, le seul modèle d'insecte endosymbiotique dont la métamorphose a été décrite est la fourmi charpentière, *Camponotus floridanus* (Stoll et al., 2010b). Au stade larvaire, l'ensemble des cellules de la couche externe de l'intestin moyen sont porteuses du symbiote primaire *Blochmania floridanus*. Au début de la métamorphose, l'intestin moyen s'élargit et seule une faible proportion de ses cellules contient *Blochmania*, puis le nombre de cellules infectées augmente jusqu'à la fin de la métamorphose, où la totalité de l'intestin est de nouveau infectée (Stoll et al., 2010b). Les mécanismes permettant ces changements de fréquence d'infection des cellules restent inconnus. Chez *S. oryzae*, la métamorphose, réalisée en seulement trois jours, s'accompagne du déplacement inter-tissulaire des endosymbiotes. *S. pierantonius* a été observé dans le milieu extracellulaire de la nymphe, associé à une induction de l'expression de gènes codant des PAMs au niveau systémique (Anselme, 2006, Anselme et al., 2006). De plus, des observations en microscopie réalisées lors de ma thèse ont montré des noyaux à chromatine condensée dans les bactériocytes d'individus en fin de dernier stade larvaire, suggérant une destruction des bactériomes larvaires par apoptose au moment du passage au stade nymphal. Ces résultats semblent indiquer que les bactériocytes imaginaux proviennent de l'infection *de novo* de cellules intestinales, vraisemblablement des cellules souches observées à multiples reprises le long de l'intestin moyen (données non publiées). Quel signal déclenche la destruction du bactériome larvaire et la sortie des endosymbiotes ? Quels mécanismes moléculaires permettent aux symbiotes de survivre dans le milieu extracellulaire et d'infecter *de novo* des cellules intestinales ? Ces mécanismes sont-ils conservés chez les

endosymbiotes « anciens » au génome dégénéré, et ne portant pas de gènes de virulence ?

### 3. Conclusions

Mon travail de thèse a permis de mettre en évidence des éléments de régulation de la réponse interne du bactériome larvaire, ainsi que l'existence d'une réponse externe induite en cas d'infection systémique. Il a aussi permis d'identifier les voies de signalisation dont l'activité est corrélée à la dynamique symbiotique chez le jeune adulte. Ce travail reste cependant focalisé uniquement sur les régulations génétiques de l'hôte. Or, l'établissement et le maintien d'une interaction endosymbiotique impliquent vraisemblablement un dialogue moléculaire entre les deux partenaires associés. Pour une meilleure compréhension de l'endosymbiose entre *S. oryzae* et *S. pierantonius*, il est donc nécessaire d'étudier de façon concomitante le dialogue de chacun des deux partenaires, plus particulièrement pendant la dynamique symbiotique chez les jeunes adultes. Cette double approche pourrait être menée sur le plan transcriptomique par des expériences de Dual RNAseq, permettant le séquençage simultané du transcriptome de l'hôte et de son symbiote. Elle pourrait être complétée par une approche fonctionnelle, par exemple par des techniques de para-transgénèse sur *S. pierantonius*. Cette dernière technique a été mise au point chez *Sodalis glossinidius* (De Vooght et al., 2014), le symbiote secondaire de la mouche Tsé-Tsé, et semble être très prometteuse chez d'autres modèles endosymbiotiques. Les questions ouvertes par ce travail soulignent que, bien que l'aspect fonctionnel des endosymbioses d'insectes soit de mieux en mieux compris, il reste beaucoup à apprendre sur la façon dont les symbiotes et leurs hôtes se « parlent » à l'échelle moléculaire.

# PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

## Publications dans des revues avec comité de lecture

**Masson F., Zaidman-Rémy A., Heddi A. Antimicrobial peptides and cell processes tracking endosymbiont dynamics.** Review invitée par Philos. Trans. R. Soc., soumise en novembre 2015.

**Masson F., Moné Y., Vigneron A., Parisot N., Vallier A., Balmand S., Vincent-Monégat C., Zaidman-Rémy A., Heddi A. (2015) Weevil endosymbiont dynamics is associated with a clamping of immunity.** BMC Genomics, 16:819

**Masson F., Vallier A., Vigneron A., Balmand S., Vincent-Monégat C., Zaidman-Rémy A., Heddi A. (2015). Systemic Infection Generates a Local-Like Immune Response of the Bacteriome Organ in Insect Symbiosis.** J. Innate Immunity, 7(3):290-301

Vigneron A., **Masson F.**, Vallier A., Balmand S., Rey M., Vincent-Monégat C., Aksoy E., Aubailly-Giraud E., Zaidman-Rémy A., Heddi A. (2014). **Insects recycle endosymbionts when the benefit is over.** Current Biology, 24(19):2267-73

## Communications orales

**Dual function of antimicrobial peptides in endosymbiosis control: Does the bacteriome immunity have a ‘split personality’?** (2015). Congrès de la Société Internationale de la Symbiose , Lisbonne, Portugal.

**Les bactériomes d’insectes génèrent une réponse immunitaire de type locale en cas d’infection bactérienne** (2014). Congrès annuel Immunité des Invertébrés (ImmunInv), Dijon, France.

**Insect bacteriome activates an immune response upon infection** (2013). Rencontre annuelle du G-RREMI (Groupe Régional de Recherche en Microbiologie des Interactions), Lyon, France.

**Insect bacteriome generates a local-like immune response following bacterial infections** (2013). Rencontre annuelle du GDRE-RA Comparative Genomics (European Research Group), Barcelone, Espagne.

## Communications affichées

**Systemic infection triggers a local-like immune response of the bacteriome organ in insect symbiosis** (2015). Congrès du réseau REID (Réseau Écologie des Interactions Durables), Lyon, France.

## *REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

- ABBY, S. S. & ROCHA, E. P. C. 2012. The Non-Flagellar Type III Secretion System Evolved from the Bacterial Flagellum and Diversified into Host-Cell Adapted Systems. *PLoS Genet*, 8, e1002983.
- ABRUDAN, J., RAMALHO-ORTIGÃO, M., O'NEIL, S., STAYBACK, G., WADSWORTH, M., BERNARD, M., SHOUE, D., EMRICH, S., LAWYER, P., KAMHAWI, S., ROWTON, E. D., LEHANE, M. J., BATES, P. A., VALENZEULA, J. G., TOMLINSON, C., APPELBAUM, E., MOELLER, D., THIESING, B., DILLON, R., CLIFTON, S., LOBO, N. F., WILSON, R. K., COLLINS, F. H. & MCDOWELL, M. A. 2013. The characterization of the *Phlebotomus papatasi* transcriptome. *Insect molecular biology*, 22, 211-232.
- AGAISSE, H., BURRACK, L. S., PHILIPS, J. A., RUBIN, E. J., PERRIMON, N. & HIGGINS, D. E. 2005. Genome-Wide RNAi Screen for Host Factors Required for Intracellular Bacterial Infection. *Science*, 309, 1248-1251.
- AGAISSE, H. & PERRIMON, N. 2004. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunological reviews*, 198, 72-82.
- AGAISSE, H., PETERSEN, U. M., BOUTROS, M., MATHEY-PREVOT, B. & PERRIMON, N. 2003. Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Developmental cell*, 5, 441-50.
- AGGARWAL, K., RUS, F., VRIESEMA-MAGNUSON, C., ERTÜRK-HASDEMİR, D., PAQUETTE, N. & SILVERMAN, N. 2008. Rudra interrupts receptor signaling complexes to negatively regulate the IMD pathway. *PLoS Pathogens*, 4, e1000120.
- AGUILÓ, N., URANGA, S., MARINOVA, D., MARTÍN, C. & PARDO, J. 2014. Bim is a crucial regulator of apoptosis induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Death & Disease*, 5, e1343.
- AKIRA, S. & TAKEDA, K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4, 499-511.
- AKMAN GUNDUZ, E. & DOUGLAS, A. E. 2009. Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 276, 987-91.
- AKMAN, L., YAMASHITA, A., WATANABE, H., OSHIMA, K., SHIBA, T., HATTORI, M. & AKSOY, S. 2002. Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature genetics*, 32, 402-7.
- ALTINCICEK, B., GROSS, J. & VILCINSKAS, A. 2008. Wounding-mediated gene expression and accelerated viviparous reproduction of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Molecular Biology*, 17, 711-716.
- ANDERS, S. & HUBER, W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 11, R106.
- ANSELME, C. 2006. *Réponse immunitaire de l'hôte dans la symbiose bactérienne intracellulaire du charançon Sitophilus zeamais*. INSA de Lyon.
- ANSELME, C., PEREZ-BROCAL, V., VALLIER, A., VINCENT-MONEGAT, C., CHARIF, D., LATORRE, A., MOYA, A. & HEDDI, A. 2008. Identification of the weevil immune genes and their expression in the bacteriome tissue. *BMC biology*, 6, 43.
- ANSELME, C., VALLIER, A., BALMAND, S., FAUVARQUE, M.-O. & HEDDI, A. 2006. Host PGRP gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil *Sitophilus zeamais*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6766-6772.

- ARAKAKI, N., MIYOSHI, T. & NODA, H. 2001. Wolbachia-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Frankliniopsis vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 268, 1011-6.
- ASGARI, S. 2011. Role of MicroRNAs in Insect Host–Microorganism Interactions. *Frontiers in Physiology*, 2, 48.
- ASHKENAZI, A. & DIXIT, V. M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-8.
- ATAK, J. M., SRIKHANTA, Y. N., FOX, K. L., JURCISEK, J. A., BROCKMAN, K. L., CLARK, T. A., BOITANO, M., POWER, P. M., JEN, F. E. C., MCEWAN, A. G., GRIMMOND, S. M., SMITH, A. L., BARENKAMP, S. J., KORLACH, J., BAKALETZ, L. O. & JENNINGS, M. P. 2015. A biphasic epigenetic switch controls immunoevasion, virulence and niche adaptation in non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Nat Commun*, 6.
- BAKER, K. D. & THUMMEL, C. S. 2007. Diabetic larvae and obese flies – emerging studies of metabolism in *Drosophila*. *Cell metabolism*, 6, 257-266.
- BALMAND, S., LOHS, C., AKSOY, S. & HEDDI, A. 2013. Tissue distribution and transmission routes for the tsetse fly endosymbionts. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, Supplement 1, S116-S122.
- BANAS, J. A., BISWAS, S. & ZHU, M. 2011. Effects of DNA Methylation on Expression of Virulence Genes in *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 7236-7242.
- BANDI, C., DUNN, A. M., HURST, G. D. & RIGAUD, T. 2001. Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. *Trends in parasitology*, 17, 88-94.
- BARILLAS-MURY, C., HAN, Y. S., SEELEY, D. & KAFATOS, F. C. 1999. Anopheles gambiae Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *The EMBO journal*, 18, 959-67.
- BARSKI, A., CUDDAPAH, S., CUI, K., ROH, T.-Y., SCHONES, D. E., WANG, Z., WEI, G., CHEPELEV, I. & ZHAO, K. 2007. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*, 129, 823-837.
- BARTEL, D. P. 2009. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136, 215-233.
- BASSET, A., KHUSH, R. S., BRAUN, A., GARDAN, L., BOCCARD, F., HOFFMANN, J. A. & LEMAITRE, B. 2000. The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 3376-81.
- BATUT, J., MERGAERT, P. & MASSON-BOIVIN, C. 2011. Peptide signalling in the rhizobium–legume symbiosis. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 181-187.
- BAUMANN, L. & BAUMANN, P. 2005. Cospeciation between the primary endosymbionts of mealybugs and their hosts. *Current microbiology*, 50, 84-7.
- BECKER, T., LOCH, G., BEYER, M., ZINKE, I., ASCHENBRENNER, A. C., CARRERA, P., INHESTER, T., SCHULTZE, J. L. & HOCH, M. 2010. FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis. *Nature*, 463, 369-373.
- BENINATI, T., LO, N., SACCHI, L., GENCHI, C., NODA, H. & BANDI, C. 2004. A novel alpha-Proteobacterium resides in the mitochondria of ovarian cells of the tick *Ixodes ricinus*. *Applied and environmental microbiology*, 70, 2596-602.
- BIAN, G., XU, Y., LU, P., XIE, Y. & XI, Z. 2010. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog*, 6, e1000833.

- BIDLA, G., LINDGREN, M., THEOPOLD, U. & DUSHAY, M. S. 2005. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. *Developmental & Comparative Immunology*, 29, 669-679.
- BIRD, A. P. & TAGGART, M. H. 1980. Variable patterns of total DNA and rDNA methylation in animals. *Nucleic Acids Research*, 8, 1485-1497.
- BISCHOFF, V., VIGNAL, C., DUVIC, B., BONECA, I. G., HOFFMANN, J. A. & ROYET, J. 2006. Downregulation of the *Drosophila* immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. *PLoS pathogens*, 2, e14.
- BOLOGNESI, R., BEERMANN, A., FARZANA, L., WITTKOPP, N., LUTZ, R., BALAVOINE, G., BROWN, S. J. & SCHRÖDER, R. 2008. *Tribolium* Wnts: evidence for a larger repertoire in insects with overlapping expression patterns that suggest multiple redundant functions in embryogenesis. *Development genes and evolution*, 218, 193-202.
- BONGIORNI, S., PUGNALI, M., VOLPI, S., BIZZARO, D., SINGH, P. & PRANTERA, G. 2009. Epigenetic marks for chromosome imprinting during spermatogenesis in coccids. *Chromosoma*, 118, 501-512.
- BOUCHON, D., RIGAUD, T. & JUCHAULT, P. 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 265, 1081-90.
- BOURTZIS, K. & O'NEIL, S. 1998. *Wolbachia* Infections and Arthropod Reproduction. *BioScience*, 48, 287-293.
- BOUTROS, M., AGAISSE, H. & PERRIMON, N. 2002. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Developmental cell*, 3, 711-22.
- BRAENDLE, C., MIURA, T., BICKEL, R., SHINGLETON, A. W., KAMBHAMPATI, S. & STERN, D. L. 2003. Developmental origin and evolution of bacteriocytes in the aphid-*Buchnera* symbiosis. *PLoS biology*, 1, E21.
- BRANDAZZA, A., ANGELI, S., TEGONI, M., CAMBILLAU, C. & PELOSI, P. 2004. Plant stress proteins of the thaumatin-like family discovered in animals. *FEBS Letters*, 572, 3-7.
- BRAQUART-VARNIER, C., LACHAT, M., HERBINIERE, J., JOHNSON, M., CAUBET, Y., BOUCHON, D. & SICARD, M. 2008. *Wolbachia* mediate variation of host immunocompetence. *PLoS One*, 3, e3286.
- BRETSCHER, A. J., HONTI, V., BINGGELI, O., BURRI, O., POIDEVIN, M., KURUCZ, É., ZSÁMBOKI, J., ANDÓ, I. & LEMAITRE, B. 2015. The Nimrod transmembrane receptor Eater is required for hemocyte attachment to the sessile compartment in *Drosophila melanogaster*. *Biology Open*, 4, 355-363.
- BREY, P. T., LEE, W. J., YAMAKAWA, M., KOIZUMI, Y., PERROT, S., FRANCOIS, M. & ASHIDA, M. 1993. Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 6275-9.
- BRONSTEIN, J. L. 1994. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, 9, 214-217.
- BROWN, B., CREED, R., SKELTON, J., ROLLINS, M. & FARRELL, K. 2012. The fine line between mutualism and parasitism: complex effects in a cleaning symbiosis demonstrated by multiple field experiments. *Oecologia*, 170, 199-207.
- BUCHNER, P. 1965. *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*, New-York, London, Sydney, Interscience Publishers, a division of Wiley & sons, Inc.



- BUCHON, N., BRODERICK, N., KURAISHI, T. & LEMAITRE, B. 2010. Drosophila EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biology*, 8, 152.
- BUCHON, N., BRODERICK, N. A. & LEMAITRE, B. 2013. Gut homeostasis in a microbial world: insights from *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Micro*, 11, 615-626.
- BUCHON, N., BRODERICK, N. A., POIDEVIN, M., PRADERVAND, S. & LEMAITRE, B. 2009. Drosophila intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell host & microbe*, 5, 200-11.
- BURNS, K., CLATWORTHY, J., MARTIN, L., MARTINON, F., PLUMPTON, C., MASCHERA, B., LEWIS, A., RAY, K., TSCHOPP, J. & VOLPE, F. 2000. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nature cell biology*, 2, 346-51.
- CARY, S. C., COTTRELL, M. T., STEIN, J. L., CAMACHO, F. & DESBRUYERES, D. 1997. Molecular Identification and Localization of Filamentous Symbiotic Bacteria Associated with the Hydrothermal Vent Annelid *Alvinella pompejana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1124-1130.
- CHANG, T. K., SHRAVAGE, B. V., HAYES, S. D., POWERS, C. M., SIMIN, R. T., WADE HARPER, J. & BAEHRECKE, E. H. 2013. Uba1 functions in Atg7- and Atg3-independent autophagy. *Nature Cell Biology*, 15, 1067-1078.
- CHANG, Y. Y. & NEUFELD, T. P. 2009. An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR-mediated autophagy regulation. *Molecular biology of the cell*, 20, 2004-14.
- CHARLES, H., HEDDI, A., GUILLAUD, J., NARDON, C. & NARDON, P. 1997. A molecular aspect of symbiotic interactions between the weevil *Sitophilus oryzae* and its endosymbiotic bacteria: Over-expression of a chaperonin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239, 769-774.
- CHARLES, H., HEDDI, A. & RAHBE, Y. 2001. A putative insect intracellular endosymbiont stem clade, within the Enterobacteriaceae, inferred from phylogenetic analysis based on a heterogeneous model of DNA evolution. *C R Acad Sci III*, 324, 489-94.
- CHAWLA, G. & SOKOL, N. S. 2011. Chapter one - MicroRNAs in Drosophila Development. In: KWANG, W. J. (ed.) *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press.
- CHEN, X., LI, S. & AKSOY, S. 1999. Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. *Journal of molecular evolution*, 48, 49-58.
- CHEONG, H., NAIR, U., GENG, J. & KLIONSKY, D. J. 2008. The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 19, 668-81.
- CHOE, K. M., LEE, H. & ANDERSON, K. V. 2005. Drosophila peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) acts as a signal-transducing innate immune receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 1122-6.
- CHRISTENSEN, B. M., LI, J., CHEN, C.-C. & NAPPI, A. J. 2005. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends in Parasitology*, 21, 192-199.

- CLARK, M. A., MORAN, N. A., BAUMANN, P. & WERNEGREEN, J. J. 2000. Cospeciation between bacterial endosymbionts (*Buchnera*) and a recent radiation of aphids (*Uroleucon*) and pitfalls of testing for phylogenetic congruence. *Evolution; international journal of organic evolution*, 54, 517-25.
- CLAYTON, A. L., OAKESON, K. F., GUTIN, M., PONTES, A., DUNN, D. M., VON NIEDERHAUSERN, A. C., WEISS, R. B., FISHER, M. & DALE, C. 2012. A Novel Human-Infection-Derived Bacterium Provides Insights into the Evolutionary Origins of Mutualistic Insect–Bacterial Symbioses. *PLoS Genet*, 8, e1002990.
- COHEN, E. D., MILLER, M. F., WANG, Z., MOON, R. T. & MORRISEY, E. E. 2012. Wnt5a and Wnt11 are essential for second heart field progenitor development. *Development (Cambridge, England)*, 139, 1931-1940.
- CONORD, C., DESPRES, L., VALLIER, A., BALMAND, S., MIQUEL, C., ZUNDEL, S., LEMPERIERE, G. & HEDDI, A. 2008. Long-term evolutionary stability of bacterial endosymbiosis in Curculionoidea: Additional evidence of symbiont replacement in the Dryophthoridae family. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 859-868.
- CORBO, J. C. & LEVINE, M. 1996. Characterization of an immunodeficiency mutant in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, 55, 211-220.
- COSTECHAREYRE, D., BALMAND, S., CONDEMIN, G. & RAHBÉ, Y. 2012. *Dickeya dadantii*, a plant pathogenic bacterium producing Cyt-like entomotoxins, causes septicemia in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS ONE*, 7, e30702.
- COSTECHAREYRE, D., CHICH, J.-F., STRUB, J.-M., RAHBÉ, Y. & CONDEMIN, G. 2013. Transcriptome of *Dickeya dadantii* infecting *Acyrtosiphon pisum* reveals a strong defense against antimicrobial peptides. *PLoS ONE*, 8, e54118.
- DAIGNEAULT, M., DE SILVA, T. I., BEWLEY, M. A., PRESTON, J. A., MARRIOTT, H. M., MITCHELL, A. M., MITCHELL, T. J., READ, R. C., WHYTE, M. K. B. & DOCKRELL, D. H. 2012. Monocytes Regulate the Mechanism of T-cell Death by Inducing Fas-Mediated Apoptosis during Bacterial Infection. *PLoS Pathogens*, 8, e1002814.
- DALE, C., JONES, T. & PONTES, M. 2005. Degenerative evolution and functional diversification of type-III secretion systems in the insect endosymbiont *Sodalis glossinidius*. *Molecular biology and evolution*, 22, 758-66.
- DALE, C., PLAGUE, G. R., WANG, B., OCHMAN, H. & MORAN, N. A. 2002. Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 12397-402.
- DALE, C., WANG, B., MORAN, N. & OCHMAN, H. 2003. Loss of DNA recombinational repair enzymes in the initial stages of genome degeneration. *Molecular biology and evolution*, 20, 1188-94.
- DAVY, S. K., ALLEMAND, D. & WEIS, V. M. 2012. Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 76, 229-261.
- DE BARY, A. 1879. De la symbiose. *Revue Inter Sci*, 3, 301-309.
- DE GREGORIO, E., SPELLMAN, P. T., TZOU, P., RUBIN, G. M. & LEMAITRE, B. 2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *The EMBO Journal*, 21, 2568-2579.
- DE VOOHT, L., CALJON, G., DE RIDDER, K. & VAN DEN ABEELE, J. 2014. Delivery of a functional anti-trypanosome Nanobody in different tsetse fly tissues via a bacterial symbiont, *Sodalis glossinidius*. *Microbial Cell Factories*, 13, 156.

- DEGNAN, P. H., LAZARUS, A. B., BROCK, C. D. & WERNEGREEN, J. J. 2004. Host-symbiont stability and fast evolutionary rates in an ant-bacterium association: cospeciation of camponotus species and their endosymbionts, candidatus blochmannia. *Systematic biology*, 53, 95-110.
- DELANEY, J. R., STOVEN, S., UVELL, H., ANDERSON, K. V., ENGSTROM, Y. & MLODZIK, M. 2006. Cooperative control of Drosophila immune responses by the JNK and NF-kappaB signaling pathways. *The EMBO journal*, 25, 3068-77.
- DEMISSIE, G., TEFERA, T. & TADESSE, A. 2008. Importance of husk covering on field infestation of maize by Sitophilus zeamais Motsch (Coleoptera: Curculionidea) at Bako, Western Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*, 7, 3777-3782.
- DI CARA, F. & KING-JONES, K. 2013. Chapter One - How Clocks and Hormones Act in Concert to Control the Timing of Insect Development. In: ANN, E. R. & MICHAEL, B. O. C. (eds.) *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press.
- DIANGELO, J. R., BLAND, M. L., BAMBINA, S., CHERRY, S. & BIRNBAUM, M. J. 2009. The immune response attenuates growth and nutrient storage in Drosophila by reducing insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 20853-20858.
- DIDIERLAURENT, A., BRISSONI, B., VELIN, D., AEBI, N., TARDIVEL, A., KASLIN, E., SIRARD, J. C., ANGELOV, G., TSCHOPP, J. & BURNS, K. 2006. Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide. *Molecular and cellular biology*, 26, 735-42.
- DIMARCQ, J.-L., IMLER, J.-L., LANOT, R., ALAN B. EZEKOWITZ, R., HOFFMANN, J. A., A. JANEWAY, C. & LAGUEUX, M. 1997. Treatment of l(2)mbn Drosophila tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27, 877-886.
- DIONNE, M. S., PHAM, L. N., SHIRASU-HIZA, M. & SCHNEIDER, D. S. 2006. Akt and foxo Dysregulation Contribute to Infection-Induced Wasting in Drosophila. *Current Biology*, 16, 1977-1985.
- DOSTERT, C., JOUANGUY, E., IRVING, P., TROXLER, L., GALIANA-ARNOUX, D., HETRU, C., HOFFMANN, J. A. & IMLER, J. L. 2005. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nat Immunol*, 6, 946-953.
- DOUGLAS, A. E. 1989. Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 64, 409-34.
- DOUGLAS, A. E., BOUVAIN, S. & RUSSELL, R. R. 2010. How the insect immune system interacts with an obligate symbiotic bacterium. *Proc Biol Sci*, 278, 333-8.
- DOUGLAS, A. E. & PROSSER, W. A. 1992. Synthesis of the essential amino acid tryptophan in the pea aphid (Acyrtosiphon pisum) symbiosis. *Journal of insect physiology*, 38, 565-568.
- DUBOIS, S., SHOU, W., HANELINE, L. S., FLEISCHER, S., WALDMANN, T. A. & MÜLLER, J. R. 2003. Distinct pathways involving the FK506-binding proteins 12 and 12.6 underlie IL-2-versus IL-15-mediated proliferation of T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 14169-14174.
- DUNN, S. R., SCHNITZLER, C. E. & WEIS, V. M. 2007. Apoptosis and autophagy as mechanisms of dinoflagellate symbiont release during cnidarian bleaching: every which way you lose. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 274, 3079-85.

- DUNN, S. R., THOMASON, J. C., LE TISSIER, M. D. & BYTHELL, J. C. 2004. Heat stress induces different forms of cell death in sea anemones and their endosymbiotic algae depending on temperature and duration. *Cell death and differentiation*, 11, 1213-22.
- DUNN, S. R. & WEIS, V. M. 2009. Apoptosis as a post-phagocytic winnowing mechanism in a coral–dinoflagellate mutualism. *Environmental Microbiology*, 11, 268-276.
- DURON, O., BOUCHON, D., BOUTIN, S., BELLAMY, L., ZHOU, L., ENGELSTADTER, J. & HURST, G. D. 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: Wolbachia do not walk alone. *BMC biology*, 6, 27.
- DWYER, M. A., JOSEPH, J., WADE, H. E., EATON, M. L., KUNDER, R. S., KAZMIN, D., CHANG, C.-Y. & MCDONNELL, D. P. 2010. WNT11 expression is induced by  $ERR\alpha$  and  $\beta$ -catenin and acts in an autocrine manner to increase cancer cell migration. *Cancer research*, 70, 9298-9308.
- DYER, K. A. & JAENIKE, J. 2004. Evolutionarily stable infection by a male-killing endosymbiont in *Drosophila innubila*: molecular evidence from the host and parasite genomes. *Genetics*, 168, 1443-55.
- EISSENBERG, J. C. & REUTER, G. 2009. Cellular Mechanism for Targeting Heterochromatin Formation in *Drosophila*. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*, 35, 495-516.
- ENGEL, P. & MORAN, N. A. 2013. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 699-735.
- EPPLER, U. D., SURIAPRANATA, I., ESKELINEN, E. L. & THUMM, M. 2001. Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *Journal of bacteriology*, 183, 5942-55.
- ERWIN, T. L. 1983. The tropical forest canopies : the last biotic frontier. *Bull. Entomol. Soc. Am.*, 29, 141.
- FELICIELLO, I., PARAZAJDER, J., AKRAP, I. & UGARKOVIĆ, Đ. 2013. First evidence of DNA methylation in insect *Tribolium castaneum*: Environmental regulation of DNA methylation within heterochromatin. *Epigenetics*, 8, 534-541.
- FERRANDON, D., JUNG, A. C., CRIQUI, M., LEMAITRE, B., UTTENWEILER-JOSEPH, S., MICHAUT, L., REICHHART, J. & HOFFMANN, J. A. 1998. A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *The EMBO journal*, 17, 1217-27.
- FESSLER, L. I., NELSON, R. E. & FESSLER, J. H. 1994. *Drosophila* extracellular matrix. In: ERKKI RUOSLAHTI, E. E. (ed.) *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- FIALHO, R. F. & STEVENS, L. 2000. Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267, 1469-1473.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811.
- FRANC, N. C., DIMARCQ, J. L., LAGUEUX, M., HOFFMANN, J. A. & EZEKOWITZ, R. A. 1996. Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity*, 4, 431-443.
- FRANK, A. B. 1877. Über die biologischen Verhältnisse des Thallus einiger Krustenflechten. *Beitr Biol Pflanz*, 2, 123-200.

- FRENTIU, F. D., ZAKIR, T., WALKER, T., POPOVICI, J., PYKE, A. T., VAN DEN HURK, A., MCGRAW, E. A. & O'NEILL, S. L. 2014. Limited Dengue Virus Replication in Field-Collected *Aedes aegypti* Mosquitoes Infected with *Wolbachia*. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e2688.
- FRY, A. J. & WERNEGREEN, J. J. 2005. The roles of positive and negative selection in the molecular evolution of insect endosymbionts. *Gene*, 355, 1-10.
- FUKATSU, T., NIKOH, N., KAWAI, R. & KOGA, R. 2000. The secondary endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: homoptera). *Applied and environmental microbiology*, 66, 2748-58.
- FULLAONDO, A. & LEE, S. Y. 2012. Identification of putative miRNA involved in *Drosophila melanogaster* immune response. *Developmental & Comparative Immunology*, 36, 267-273.
- GABRIEL, W., LYNCH, M. & BURGER, R. 1993. Muller's Ratchet and mutational meltdowns. *Evolution*, 47, 1744-1757.
- GALAN, J. E. & COLLMER, A. 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 284, 1322-8.
- GALKO, M. J. & KRASNOW, M. A. 2004. Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS biology*, 2, E239.
- GARCIA, J. R. & GERARDO, N. M. 2014. The symbiont side of symbiosis: do microbes really benefit? *Frontiers in Microbiology*, 5, 510.
- GARVER, L. S., WU, J. & WU, L. P. 2006. The peptidoglycan recognition protein PGRP-SC1a is essential for Toll signaling and phagocytosis of *Staphylococcus aureus* in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 660-665.
- GASNIER-FAUCHET, F., GHARIB, A. & NARDON, P. 1986. Comparison of methionine metabolism in symbiotic and aposymbiotic larvae of *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) - I. Evidence for a Glycine N-methyltransferase-like activity in the aposymbiotic larvae. *Comp Biochem Physiol*, 85B, 245-250.
- GAY, N. J. & KEITH, F. J. 1991. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*, 351, 355-356.
- GENDRIN, M., WELCHMAN, D. P., POIDEVIN, M., HERVÉ, M. & LEMAITRE, B. 2009. Long-Range Activation of Systemic Immunity through Peptidoglycan Diffusion in *Drosophila*. *PLoS Pathog*, 5, e1000694.
- GEORGEL, P., NAITZA, S., KAPPLER, C., FERRANDON, D., ZACHARY, D., SWIMMER, C., KOPCZYNSKI, C., DUYK, G., REICHHART, J. M. & HOFFMANN, J. A. 2001. *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Dev Cell*, 1, 503-14.
- GERARDO, N. M., ALTINCICEK, B., ANSELME, C., ATAMIAN, H., BARRIBEAU, S. M., DE VOS, M., DUNCAN, E. J., EVANS, J. D., GABALDON, T., GHANIM, M., HEDDI, A., KALOSHIAN, I., LATORRE, A., MOYA, A., NAKABACHI, A., PARKER, B. J., PEREZ-BROCAL, V., PIGNATELLI, M., RAHBE, Y., RAMSEY, J. S., SPRAGG, C. J., TAMAMES, J., TAMARIT, D., TAMBORINDEGUY, C., VINCENT-MONEGAT, C. & VILCINSKAS, A. 2010. Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *Genome Biol*, 11, R21.
- GIGA, D. P., MUTEMERUWA, S., MOYO, G. & NEELEY, D. 1991. Assessment and control of losses caused by insect pests in small farmers' stores in Zimbabwe. *Crop Protection*, 10, 287-292.

- GOBERT, V., GOTTAR, M., MATSKEVICH, A. A., RUTSCHMANN, S., ROYET, J., BELVIN, M., HOFFMANN, J. A. & FERRANDON, D. 2003. Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science*, 302, 2126-30.
- GÓMEZ-VALERO, L., LATORRE, A. & SILVA, F. J. 2004. The Evolutionary Fate of Nonfunctional DNA in the Bacterial Endosymbiont *Buchnera aphidicola*. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 2172-2181.
- GOMEZ-VALERO, L., SORIANO-NAVARRO, M., PEREZ-BROCAL, V., HEDDI, A., MOYA, A., GARCIA-VERDUGO, J. M. & LATORRE, A. 2004. Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a secondary symbiont in the aphid *Cinara cedri*. *J Bacteriol*, 186, 6626-33.
- GORSKI, S. M., CHITTARANJAN, S., PLEASANCE, E. D., FREEMAN, J. D., ANDERSON, C. L., VARHOL, R. J., COUGHLIN, S. M., ZUYDERDUYN, S. D., JONES, S. J. M. & MARRA, M. A. 2003. A SAGE approach to discovery of genes involved in autophagic cell death. *Current Biology*, 13, 358-363.
- GOTO, A., FUKUYAMA, H., IMLER, J.-L. & HOFFMANN, J. A. 2014. The Chromatin Regulator DMAP1 Modulates Activity of the Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Transcription Factor Relish in the *Drosophila* Innate Immune Response. *The Journal of Biological Chemistry*, 289, 20470-20476.
- GOTTAR, M., GOBERT, V., MICHEL, T., BELVIN, M., DUYK, G., HOFFMANN, J. A., FERRANDON, D. & ROYET, J. 2002. The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 416, 640-4.
- GREEN, B. J., LI, W.-Y., MANHART, J. R., FOX, T. C., SUMMER, E. J., KENNEDY, R. A., PIERCE, S. K. & RUMPHO, M. E. 2000. Mollusc-Algal Chloroplast Endosymbiosis. Photosynthesis, Thylakoid Protein Maintenance, and Chloroplast Gene Expression Continue for Many Months in the Absence of the Algal Nucleus. *Plant Physiology*, 124, 331-342.
- GRENIER, A.-M., DUPORT, G., PAGÈS, S., CONDEMINÉ, G. & RAHBÉ, Y. 2006. The phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) is a pathogen of the pea aphid. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1956-1965.
- GRENIER, A. M., NARDON, C. & NARDON, P. 1994. the role of symbionts in flight activity of *Sitophilus* weevils. *Entomol exp appl*, 70, 201-208.
- GRIMALDI, D. & ENGEL, M. S. 2005. *Evolution of the Insects*, New York, NY, Cambridge University Press.
- GROSS, R., VAVRE, F., HEDDI, A., HURST, G. D., ZCHORI-FEIN, E. & BOURTZIS, K. 2009. Immunity and symbiosis. *Mol Microbiol*, 73, 751-9.
- GULLAN, P. J. & CRANSTON, P. S. 2005. *Life History Patterns and Phases in The Insects: An Outline of Entomology*, Blackwell Publishing.
- HA, E. M., OH, C. T., BAE, Y. S. & LEE, W. J. 2005. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science*, 310, 847-50.
- HA, E. M., OH, C. T., RYU, J. H., BAE, Y. S., KANG, S. W., JANG, I. H., BREY, P. T. & LEE, W. J. 2005b. An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*. *Developmental cell*, 8, 125-32.
- HAN, S. H., RYU, J. H., OH, C. T., NAM, K. B., NAM, H. J., JANG, I. H., BREY, P. T. & LEE, W. J. 2004. The moleskin gene product is essential for Caudal-mediated constitutive antifungal Drosomycin gene expression in *Drosophila* epithelia. *Insect Molecular Biology*, 13, 323-327.
- HANNON, G. J. 2002. RNA interference. *Nature*, 418, 244-251.

- HAWKINS, C. J., EKERT, P. G., UREN, A. G., HOLMGREEN, S. P. & VAUX, D. L. 1998. Anti-apoptotic potential of insect cellular and viral IAPs in mammalian cells. *Cell Death and Differentiation*, 5, 569-576.
- HAY, N. & SONENBERG, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development*, 18, 1926-1945.
- HAYASHI, M., SHIRO, S., KANAMORI, H., MORI-HOSOKAWA, S., SASAKI-YAMAGATA, H., SAYAMA, T., NISHIOKA, M., TAKAHASHI, M., ISHIMOTO, M., KATAYOSE, Y., KAGA, A., HARADA, K., KOUCHI, H., SAEKI, Y. & UMEHARA, Y. 2014. A Thaumatin-Like Protein, Rj4, Controls Nodule Symbiotic Specificity in Soybean. *Plant and Cell Physiology*, 55, 1679-1689.
- HE, C. & KLIONSKY, D. J. 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics*, 43, 67-93.
- HEDDI, A. 2003. Endosymbiosis in the weevil of genus *Sitophilus*: genetic, physiological and molecular interactions among associated genomes. In: BOURTZIS, K. & MILLER, A. (eds.) *Insect Symbiosis*. New-York: CRC Press LLC.
- HEDDI, A., CHARLES, H., KHATCHADOURIAN, C., BONNOT, G. & NARDON, P. 1998. Molecular characterization of the principal symbiotic bacteria of the weevil *Sitophilus oryzae*: a peculiar G + C content of an endocytobiotic DNA. *Journal of molecular evolution*, 47, 52-61.
- HEDDI, A., GRENIER, A. M., KHATCHADOURIAN, C., CHARLES, H. & NARDON, P. 1999. Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and Wolbachia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6814-9.
- HEDDI, A., LEFEBVRE, F. & NARDON, P. 1993. Effect of endocytobiotic bacteria on mitochondrial enzymatic activities in the weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera : Curculionidae). *Insect biochemistry and molecular biology*, 23, 403-411.
- HEDDI, A., VALLIER, A., ANSELME, C., XIN, H., RAHBE, Y. & WACKERS, F. 2005. Molecular and cellular profiles of insect bacteriocytes: mutualism and harm at the initial evolutionary step of symbiogenesis. *Cell Microbiol*, 7, 293-305.
- HEDENGREN, M., ASLING, B., DUSHAY, M. S., ANDO, I., EKENGREN, S., WIHLBORG, M. & HULTMARK, D. 1999. Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Molecular cell*, 4, 827-37.
- HENGARTNER, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-6.
- HERREN, J. K., PAREDES, J. C., SCHÜPFER, F. & LEMAITRE, B. 2013. Vertical Transmission of a *Drosophila* Endosymbiont Via Cooption of the Yolk Transport and Internalization Machinery. *mBio*, 4.
- HILGENBOECKER, K., HAMMERSTEIN, P., SCHLATTMANN, P., TELSCHOW, A. & WERREN, J. H. 2008. How many species are infected with Wolbachia?--A statistical analysis of current data. *FEMS microbiology letters*, 281, 215-20.
- HORNG, T. & MEDZHITOV, R. 2001. *Drosophila* MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 12654-12658.
- HOSOKAWA, T., KOGA, R., KIKUCHI, Y., MENG, X. Y. & FUKATSU, T. 2010. Wolbachia as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 769-74.
- HOSOKAWA, T., NIKOH, N., KOGA, R., SATO, M., TANAHASHI, M., MENG, X. Y. & FUKATSU, T. 2012. Reductive genome evolution, host-symbiont co-speciation and uterine transmission of endosymbiotic bacteria in bat flies. *The ISME journal*, 6, 577-87.

- HOWIE, H. L., SHIFLETT, S. L. & SO, M. 2008. Extracellular signal-regulated kinase activation by *Neisseria gonorrhoeae* downregulates epithelial cell proapoptotic proteins Bad and Bim. *Infection and immunity*, 76, 2715-21.
- HUNDSDOERFER, A. K., RHEINHEIMER, J. & WINK, M. 2009. Towards the phylogeny of the Curculionoidea (Coleoptera): Reconstructions from mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences. *Zoologischer Anzeiger*, 248, 9-31.
- IP, Y. T., REACH, M., ENGSTROM, Y., KADALAYIL, L., CAI, H., GONZALEZ-CRESPO, S., TATEI, K. & LEVINE, M. 1993. Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. *Cell*, 75, 753-63.
- JAGER, S., BUCCI, C., TANIDA, I., UENO, T., KOMINAMI, E., SAFTIG, P. & ESKELINEN, E. L. 2004. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of cell science*, 117, 4837-48.
- JIGGINS, F. M., HURST, G. D., JIGGINS, C. D., V D SCHULENBURG, J. H. & MAJERUS, M. E. 2000. The butterfly *Danaus chrysippus* is infected by a male-killing *Spiroplasma* bacterium. *Parasitology*, 120 ( Pt 5), 439-46.
- JIN, Q., YUAN, Z., XU, J., WANG, Y., SHEN, Y., LU, W., WANG, J., LIU, H., YANG, J., YANG, F., ZHANG, X., ZHANG, J., YANG, G., WU, H., QU, D., DONG, J., SUN, L., XUE, Y., ZHAO, A., GAO, Y., ZHU, J., KAN, B., DING, K., CHEN, S., CHENG, H., YAO, Z., HE, B., CHEN, R., MA, D., QIANG, B., WEN, Y., HOU, Y. & YU, J. 2002. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Research*, 30, 4432-4441.
- JOHANOWICZ, D. & HOY, M. 1998. The manipulation of arthropod reproduction by *Wolbachia*. *The Florida Entomologist*, 81, 310-317.
- JUHASZ, G. & NEUFELD, T. P. 2006. Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source. *PLoS biology*, 4, e36.
- JUNG, C. H., RO, S.-H., CAO, J., OTTO, N. M. & KIM, D.-H. 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters*, 584, 1287-1295.
- KABEYA, Y., KAMADA, Y., BABA, M., TAKIKAWA, H., SASAKI, M. & OHSUMI, Y. 2005. Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Molecular biology of the cell*, 16, 2544-53.
- KADALAYIL, L., PETERSEN, U. M. & ENGSTRÖM, Y. 1997. Adjacent GATA and kappa B-like motifs regulate the expression of a *Drosophila* immune gene. *Nucleic Acids Research*, 25, 1233-1239.
- KALLIO, J., LEINONEN, A., ULVILA, J., VALANNE, S., EZEKOWITZ, R. A. & RAMET, M. 2005. Functional analysis of immune response genes in *Drosophila* identifies JNK pathway as a regulator of antimicrobial peptide gene expression in S2 cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 7, 811-9.
- KALTENPOTH, M., GOETTLER, W., KOEHLER, S. & STROHM, E. 2010. Life cycle and population dynamics of a protective insect symbiont reveal severe bottlenecks during vertical transmission. *Evol Ecol*, 24, 463-477.
- KAMADA, Y., FUNAKOSHI, T., SHINTANI, T., NAGANO, K., OHSUMI, M. & OHSUMI, Y. 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *The Journal of cell biology*, 150, 1507-13.
- KANEHISA, M., GOTO, S., SATO, Y., FURUMICHI, M. & TANABE, M. 2012. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Research*, 40, D109-D114.



- KANEHISA, M., GOTO, S., SATO, Y., KAWASHIMA, M., FURUMICHI, M. & TANABE, M. 2014. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 42, D199-D205.
- KANEKO, T., YANO, T., AGGARWAL, K., LIM, J. H., UEDA, K., OSHIMA, Y., PEACH, C., ERTURK-HASDEMIR, D., GOLDMAN, W. E., OH, B. H., KURATA, S. & SILVERMAN, N. 2006. PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the drosophila immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nature immunology*, 7, 715-23.
- KANNAN, K. & FRIDELL, Y.-W. C. 2013. Functional implications of Drosophila insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction. *Frontiers in Physiology*, 4, 288.
- KATOH, Y., SHIBA, Y., MITSUHASHI, H., YANAGIDA, Y., TAKATSU, H. & NAKAYAMA, K. 2004. Tollip and Tom1 Form a Complex and Recruit Ubiquitin-conjugated Proteins onto Early Endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 24435-24443.
- KAUFMANN, S. H. & HENGARTNER, M. O. 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in cell biology*, 11, 526-34.
- KAWAMATA, T., KAMADA, Y., KABEYA, Y., SEKITO, T. & OHSUMI, Y. 2008. Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation. *Molecular biology of the cell*, 19, 2039-50.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26, 239-57.
- KIKUCHI, Y., HOSOKAWA, T. & FUKATSU, T. 2007. Insect-Microbe Mutualism without Vertical Transmission: a Stinkbug Acquires a Beneficial Gut Symbiont from the Environment Every Generation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4308-4316.
- KIKUCHI, Y., HOSOKAWA, T., NIKOH, N., MENG, X. Y., KAMAGATA, Y. & FUKATSU, T. 2009. Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs. *BMC biology*, 7, 2.
- KIM, S. K. & RULIFSON, E. J. 2004. Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by Drosophila corpora cardiaca cells. *Nature*, 431, 316-320.
- KLEINO, A., MYLLYMAKI, H., KALLIO, J., VANHA-AHO, L. M., OKSANEN, K., ULVILA, J., HULTMARK, D., VALANNE, S. & RAMET, M. 2008. Pirk is a negative regulator of the Drosophila Imd pathway. *Journal of immunology*, 180, 5413-22.
- KLEINO, A., VALANNE, S., ULVILA, J., KALLIO, J., MYLLYMAKI, H., ENWALD, H., STOVEN, S., POIDEVIN, M., UEDA, R., HULTMARK, D., LEMAITRE, B. & RAMET, M. 2005. Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the Drosophila Imd pathway. *The EMBO journal*, 24, 3423-34.
- KLIONSKY, D. J., CREGG, J. M., DUNN, W. A., EMR, S. D., SAKAI, Y., SANDOVAL, I. V., SIBIRNY, A., SUBRAMANI, S., THUMM, M., VEENHUIS, M. & OHSUMI, M. 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental cell*, 5, 539-545.
- KOCKS, C., CHO, J. H., NEHME, N., ULVILA, J., PEARSON, A. M., MEISTER, M., STROM, C., CONTO, S. L., HETRU, C., STUART, L. M., STEHLE, T., HOFFMANN, J. A., REICHHART, J.-M., FERRANDON, D., RÄMET, M. & EZEKOWITZ, R. A. B. 2005. Eater, a Transmembrane Protein Mediating Phagocytosis of Bacterial Pathogens in Drosophila. *Cell*, 123, 335-346.

- KOGA, R., TSUCHIDA, T. & FUKATSU, T. 2003. Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont Buchnera in an aphid. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 270, 2543-50.
- KONDRASHOV, A. S. 1988. Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature*, 336, 435-440.
- KONO, M., KOGA, R., SHIMADA, M. & FUKATSU, T. 2008. Infection dynamics of coexisting beta- and gammaproteobacteria in the nested endosymbiotic system of mealybugs. *Applied and environmental microbiology*, 74, 4175-84.
- KOPP, E., MEDZHITOV, R., CAROTHERS, J., XIAO, C., DOUGLAS, I., JANEWAY, C. A. & GHOSH, S. 1999. ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev*, 13, 2059-71.
- KOSTIC, A. D., HOWITT, M. R. & GARRETT, W. S. 2013. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes & Development*, 27, 701-718.
- KOTHAKOTA, S., AZUMA, T., REINHARD, C., KLIPPEL, A., TANG, J., CHU, K., MCGARRY, T. J., KIRSCHNER, M. W., KOTHS, K., KWIATKOWSKI, D. J. & WILLIAMS, L. T. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, 278, 294-8.
- KOUNATIDIS, I. & LIGOXYGAKIS, P. 2012. Drosophila as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. *Open Biology*, 2, 120075.
- KOZOPAS, K. M. & NUSSE, R. 2002. Direct Flight Muscles in Drosophila Develop from Cells with Characteristics of Founders and Depend on DWnt-2 for Their Correct Patterning. *Developmental Biology*, 243, 312-325.
- KOZOPAS, K. M., SAMOS, C. H. & NUSSE, R. 1998. DWnt-2, a Drosophila Wnt gene required for the development of the male reproductive tract, specifies a sexually dimorphic cell fate. *Genes & Development*, 12, 1155-1165.
- KREMER, N., VORONIN, D., CHARIF, D., MAVINGUI, P., MOLLEREAU, B. & VAVRE, F. 2009. Wolbachia interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. *PLoS Pathog*, 5, e1000630.
- KRESSE, A. U., DINESH, S. D., LARBIG, K. & ROMLING, U. 2003. Impact of large chromosomal inversions on the adaptation and evolution of Pseudomonas aeruginosa chronically colonizing cystic fibrosis lungs. *Molecular microbiology*, 47, 145-58.
- KUCHARSKI, R., MALESZKA, J., FORET, S. & MALESZKA, R. 2008. Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation. *Science*, 319, 1827-1830.
- KURUCZ, E., MÁRKUS, R., ZSÁMBOKI, J., FOLKL-MEDZIHRADESKY, K., DARULA, Z., VILMOS, P., UDVARDY, A., KRAUSZ, I., LUKACSOVICH, T., GATEFF, E., ZETTERVALL, C. J., HULTMARK, D. & ANDÓ, I. 2007. Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in Drosophila plasmatocytes. *Current Biology*, 17, 649-654.
- LAGUEUX, M., PERRODOU, E., LEVASHINA, E. A., CAPOVILLA, M. & HOFFMANN, J. A. 2000. Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 11427-32.
- LAMELAS, A., GOSALBES, M. J., MANZANO-MARÍN, A., PERETÓ, J., MOYA, A. & LATORRE, A. 2011. Serratia symbiotica from the Aphid Cinara cedri: A Missing Link from Facultative to Obligate Insect Endosymbiont. *PLoS Genetics*, 7, e1002357.

- LANOT, R., ZACHARY, D., HOLDER, F. & MEISTER, M. 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental biology*, 230, 243-57.
- LATORRE, A., GIL, R., SILVA, F. J. & MOYA, A. 2005. Chromosomal stasis versus plasmid plasticity in aphid endosymbiont *Buchnera aphidicola*. *Heredity*, 95, 339-47.
- LE BRIS, N. & GAILL, F. 2007. How does the annelid *Alvinella pompejana* deal with an extreme hydrothermal environment? *Critical Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 6, 197-221.
- LE CLECH, W., BRAQUART-VARNIER, C., RAIMOND, M., FERDY, J.-B., BOUCHON, D. & SICARD, M. 2012. High Virulence of *Wolbachia* after Host Switching: When Autophagy Hurts. *PLoS Pathog*, 8, e1002844.
- LEE, R. C., FEINBAUM, R. L. & AMBROS, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-854.
- LEFÈVRE, C., CHARLES, H., VALLIER, A., DELOBEL, B., FARRELL, B. & HEDDI, A. 2004. Endosymbiont phylogenesis in the Dryophthoridae weevils: Evidence for bacterial replacement. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 965-973.
- LEMAITRE, B. & HOFFMANN, J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*, 25, 697-743.
- LEMAITRE, B., KROMER-METZGER, E., MICHAUT, L., NICOLAS, E., MEISTER, M., GEORGEL, P., REICHHART, J. M. & HOFFMANN, J. A. 1995b. A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 9465-9.
- LEMAITRE, B., MEISTER, M., GOVIND, S., GEORGEL, P., STEWARD, R., REICHHART, J. M. & HOFFMANN, J. A. 1995. Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in *Drosophila*. *The EMBO journal*, 14, 536-45.
- LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J. M. & HOFFMANN, J. A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86, 973-83.
- LEMAITRE, B., REICHHART, J. M. & HOFFMANN, J. A. 1997. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 14614-9.
- LEOPOLD, P. & PERRIMON, N. 2007. *Drosophila* and the genetics of the internal milieu. *Nature*, 450, 186-188.
- LEULIER, F., LHOCINE, N., LEMAITRE, B. & MEIER, P. 2006. The *Drosophila* inhibitor of apoptosis protein DIAP2 functions in innate immunity and is essential to resist gram-negative bacterial infection. *Molecular and cellular biology*, 26, 7821-31.
- LEULIER, F., PARQUET, C., PILI-FLOURY, S., RYU, J. H., CAROFF, M., LEE, W. J., MENGIN-LECREULX, D. & LEMAITRE, B. 2003. The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nature immunology*, 4, 478-84.
- LEULIER, F., RODRIGUEZ, A., KHUSH, R. S., ABRAMS, J. M. & LEMAITRE, B. 2000. The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep*, 1, 353-8.

- LEVINE, B., MIZUSHIMA, N. & VIRGIN, H. W. 2011. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, 469, 323-335.
- LEWIN, R. A. 1982. Symbiosis and Parasitism—Definitions and Evaluations. *BioScience*, 32, 254, 256, 259-260.
- LHOCINE, N., RIBEIRO, P. S., BUCHON, N., WEPF, A., WILSON, R., TENEV, T., LEMAITRE, B., GSTAIGER, M., MEIER, P. & LEULIER, F. 2008. PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating *Drosophila* innate immune signaling. *Cell Host & Microbe*, 4, 147-158.
- LI, E., BEARD, C. & JAENISCH, R. 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366, 362-365.
- LIEHL, P., BLIGHT, M., VODOVAR, N., BOCCARD, F. & LEMAITRE, B. 2006. Prevalence of Local Immune Response against Oral Infection in a *Drosophila/Pseudomonas* Infection Model. *PLoS Pathog*, 2, e56.
- LIGOXYKAKIS, P., PELTE, N., HOFFMANN, J. & REICHHART, J.-M. 2002. Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science*, 297, 114-116.
- LLIMARGAS, M. & LAWRENCE, P. A. 2001. Seven Wnt homologues in *Drosophila*: A case study of the developing tracheae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 14487-14492.
- LOCKSLEY, R. M., KILLEEN, N. & LENARDO, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104, 487-501.
- LOGIN, F. H., BALMAND, S., VALLIER, A., VINCENT-MONÉGAT, C., VIGNERON, A., WEISS-GAYET, M., ROCHAT, D. & HEDDI, A. 2011. Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. *Science*, 334, 362-365.
- LOGIN, F. H. & HEDDI, A. 2013. Insect immune system maintains long-term resident bacteria through a local response. *Journal of Insect Physiology*, 59, 232-239.
- LÓPEZ-MADRIGAL, S., LATORRE, A., PORCAR, M., MOYA, A. & GIL, R. 2013. Mealybugs nested endosymbiosis: going into the ‘matryoshka’ system in *Planococcus citri* in depth. *BMC Microbiology*, 13, 1-12.
- LOW, P., VARGA, A., PIRCS, K., NAGY, P., SZATMÁRI, Z., SASS, M. & JUHÁSZ, G. 2013. Impaired proteasomal degradation enhances autophagy via hypoxia signaling in *Drosophila*. *BMC Cell Biology*, 14, 29.
- LU, K. & PSAKHIE, S. 2014. Autophagic clearance of polyQ proteins mediated by ubiquitin-Atg8 adaptors of the conserved CUET protein family. *Cell*, 158, 549-563.
- LYKO, F., RAMSAHOYE, B. H. & JAENISCH, R. 2000. Development: DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 408, 538-540.
- MAESTRO, J. L., COBO, J. & BELLÉS, X. 2009. Target of Rapamycin (TOR) Mediates the Transduction of Nutritional Signals into Juvenile Hormone Production. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 5506-5513.
- MAILLET, F., BISCHOFF, V., VIGNAL, C., HOFFMANN, J. & ROYET, J. 2008. The *Drosophila* peptidoglycan recognition protein PGRP-LF blocks PGRP-LC and IMD/JNK pathway activation. *Cell host & microbe*, 3, 293-303.
- MANAKA, J., KURAISHI, T., SHIRATSUCHI, A., NAKAI, Y., HIGASHIDA, H., HENSON, P. M. & NAKANISHI, Y. 2004. Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 48466-76.
- MANDYAM, K. G. & JUMPPONEN, A. 2015. Mutualism-parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. *Frontiers in Microbiology*, 5.

- MARGULIS, L. 1990. Words as battle cries—symbiogenesis and the new field of endocytobiology. *BioScience*, 40, 673-677.
- MASSON, F., VALLIER, A., VIGNERON, A., BALMAND, S., VINCENT-MONÉGAT, C., ZAIDMAN-RÉMY, A. & HEDDI, A. 2015. Systemic infection generates a local-like immune response of the bacteriome organ in insect symbiosis. *Journal of Innate Immunity*, 7, 290-301.
- MATSUZAKI, K. 1999. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1462, 1-10.
- MAZZON, L., MARTINEZ-SANUDO, I., SIMONATO, M., SQUARTINI, A., SAVIO, C. & GIROLAMI, V. 2010. Phylogenetic relationships between flies of the Tephritinae subfamily (Diptera, Tephritidae) and their symbiotic bacteria. *Molecular phylogenetics and evolution*, 56, 312-26.
- MCCUTCHEON, J. P. & MORAN, N. A. 2007. Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 19392-7.
- MCFALL-NGAI, M. 2014. Divining the Essence of Symbiosis: Insights from the Squid-Vibrio Model. *PLoS Biology*, 12, e1001783.
- MCFALL-NGAI, M., HEATH-HECKMAN, E. A. C., GILLETTE, A. A., PEYER, S. M. & HARVIE, E. A. 2012. The secret languages of coevolved symbioses: Insights from the Euprymna scolopes–Vibrio fischeri symbiosis. *Seminars in Immunology*, 24, 3-8.
- MCFALL-NGAI, M. J. & RUBY, E. G. 1991. Symbiont recognition and subsequent morphogenesis as early events in an animal–bacterial mutualism. *Science*, 254.
- MCILROY, G., FOLDI, I., AURIKKO, J., WENTZELL, J. S., LIM, M. A., FENTON, J. C., GAY, N. J. & HIDALGO, A. 2013. Toll-6 and Toll-7 function as neurotrophin receptors in the Drosophila melanogaster CNS. *Nat Neurosci*, 16, 1248-1256.
- MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P. & JANEWAY, C. A. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388, 394-397.
- MEINANDER, A., RUNCHEL, C., TENEV, T., CHEN, L., KIM, C. H., RIBEIRO, P. S., BROEMER, M., LEULIER, F., ZVELEBIL, M., SILVERMAN, N. & MEIER, P. 2012. Ubiquitylation of the initiator caspase DREDD is required for innate immune signalling. *The EMBO Journal*, 31, 2770-2783.
- MEISTER, M. 2004. Blood cells of Drosophila: cell lineages and role in host defence. *Current opinion in immunology*, 16, 10-5.
- MEISTER, M. & RICHARDS, G. 1996. Ecdysone and insect immunity: The maturation of the inducibility of the dipterin gene in Drosophila larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26, 155-160.
- MELLROTH, P., KARLSSON, J. & STEINER, H. 2003. A scavenger function for a Drosophila peptidoglycan recognition protein. *The Journal of biological chemistry*, 278, 7059-64.
- MICHEL, T., REICHHART, J. M., HOFFMANN, J. A. & ROYET, J. 2001. Drosophila Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 414, 756-9.
- MISHIMA, Y., QUINTIN, J., AIMANIANDA, V., KELLENBERGER, C., COSTE, F., CLAVAUD, C., HETRU, C., HOFFMANN, J. A., LATGE, J. P., FERRANDON, D. & ROUSSEL, A. 2009. The N-terminal domain of Drosophila Gram-negative

- binding protein 3 (GNBP3) defines a novel family of fungal pattern recognition receptors. *The Journal of biological chemistry*, 284, 28687-97.
- MIURA, T., BRAENDLE, C., SHINGLETON, A., SISK, G., KAMBHAMPATI, S. & STERN, D. L. 2003. A comparison of parthenogenetic and sexual embryogenesis of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 295B, 59-81.
- MOLL, R. M., ROMOSER, W. S., MODRAKOWSKI, M. C., MONCAYO, A. C. & LERDTHUSNEE, K. 2001. Meconial Peritrophic Membranes and the Fate of Midgut Bacteria During Mosquito (Diptera: Culicidae) Metamorphosis. *Journal of Medical Entomology*, 38, 29-32.
- MONTGOMERY, M. K., XU, S. & FIRE, A. 1998. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 15502-15507.
- MONTLLOR, C. B., MAXMEN, A. & PURCELL, A. H. 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology*, 27, 189-195.
- MORAN, N. & BAUMANN, P. 1994. Phylogenetics of cytoplasmically inherited microorganisms of arthropods. *Trends Ecol Evol*, 9, 15-20.
- MORAN, N. A. 1996. Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 2873-8.
- MORAN, N. A., MCCUTCHEON, J. P. & NAKABACHI, A. 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual review of genetics*, 42, 165-90.
- MORAN, N. A. & MIRA, A. 2001. The process of genome shrinkage in the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *Genome biology*, 2, RESEARCH0054.
- MORAN, N. A., MUNSON, M. A., BAUMANN, P. & ISHIKAWA, H. 1993. A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 253, 167-171.
- MORAN, N. A. & PLAGUE, G. R. 2004. Genomic changes following host restriction in bacteria. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14, 627-633.
- MORAN, N. A. & TELANG, A. 1998. Bacteriocyte-associated symbionts of insects. *BioScience*, 48, 295-304.
- MORAN, N. A. & WERNEGREN, J. J. 2000. Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. *Trends in ecology & evolution*, 15, 321-326.
- MOREIRA, L. A., ITURBE-ORMAETXE, I., JEFFERY, J. A., LU, G., PYKE, A. T., HEDGES, L. M., ROCHA, B. C., HALL-MENDELIN, S., DAY, A., RIEGLER, M., HUGO, L. E., JOHNSON, K. N., KAY, B. H., MCGRAW, E. A., VAN DEN HURK, A. F., RYAN, P. A. & O'NEILL, S. L. 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, 139, 1268-78.
- MORESCO, E. M. Y., LAVINE, D. & BEUTLER, B. 2011. Toll-like receptors. *Current Biology*, 21, R488-R493.
- MORET, Y. & SCHMID-HEMPEL, P. 2000. Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science*, 290, 1166-8.
- MORGAN, M., ANDERS, S., LAWRENCE, M., ABOYOUN, P., PAGÈS, H. & GENTLEMAN, R. 2009. ShortRead: a bioconductor package for input, quality assessment and exploration of high-throughput sequence data. *Bioinformatics*, 25, 2607-2608.

- MURAT, S., HOPFEN, C. & MCGREGOR, A. P. 2010. The function and evolution of Wnt genes in arthropods. *Arthropod Structure & Development*, 39, 446-452.
- NAITZA, S., ROSSE, C., KAPPLER, C., GEORGEL, P., BELVIN, M., GUBB, D., CAMONIS, J., HOFFMANN, J. A. & REICHHART, J. M. 2002. The *Drosophila* immune defense against gram-negative infection requires the death protein dFADD. *Immunity*, 17, 575-581.
- NAKABACHI, A., SHIGENOBU, S., SAKAZUME, N., SHIRAKI, T., HAYASHIZAKI, Y., CARNINCI, P., ISHIKAWA, H., KUDO, T. & FUKATSU, T. 2005. Transcriptome analysis of the aphid bacteriocyte, the symbiotic host cell that harbors an endocellular mutualistic bacterium, *Buchnera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 5477-82.
- NAKAMOTO, M., MOY, RYAN H., XU, J., BAMBINA, S., YASUNAGA, A., SHELLY, SPENCER S., GOLD, B. & CHERRY, S. 2012. Virus Recognition by Toll-7 Activates Antiviral Autophagy in *Drosophila*. *Immunity*, 36, 658-667.
- NAKAYAMA, K., YAMASHITA, A., KUROKAWA, K., MORIMOTO, T., OGAWA, M., FUKUHARA, M., URAKAMI, H., OHNISHI, M., UCHIYAMA, I., OGURA, Y., OOKA, T., OSHIMA, K., TAMURA, A., HATTORI, M. & HAYASHI, T. 2008. The Whole-genome Sequencing of the Obligate Intracellular Bacterium *Orientia tsutsugamushi* Revealed Massive Gene Amplification During Reductive Genome Evolution. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 15, 185-199.
- NARDON, P. 1973. Obtention d'une souche aposymbiotique chez le charançon *Sitophilus sasakii* Tak : différentes méthodes d'obtention et comparaison avec la souche symbiotique d'origine. *C R Acad Sci Paris.*, 272D, 981-984.
- NARDON, P. 1978. *Etude des interactions physiologiques et génétiques entre l'hôte et les symbiotes chez le coléoptère Curculionidae Sitophilus sasakii (= S. oryzae)*. Thèse, INSA - Université Lyon I.
- NARDON, P. & GRENIER, A. M. 1991. Serial endosymbiosis theory and weevil evolution: the role of symbiosis. In: MARGULIS, L. & FESTER, R. (eds.) *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis*. Cambridge, MA: MIT Press.
- NARDON, P. & WICKER, C. 1981. La symbiose chez le genre *Sitophilus* (Coléoptère, Curculionidae). Principaux aspects morphologiques, physiologiques et génétiques. *Ann. Biol.*, 20, 327-373.
- NICOLAS, E., REICHHART, J. M., HOFFMANN, J. A. & LEMAITRE, B. 1998. In vivo regulation of the IkappaB homologue cactus during the immune response of *Drosophila*. *The Journal of biological chemistry*, 273, 10463-9.
- NIKOH, N., HOSOKAWA, T., OSHIMA, K., HATTORI, M. & FUKATSU, T. 2011. Reductive Evolution of Bacterial Genome in Insect Gut Environment. *Genome biology and evolution*.
- NOGGE, G. 1976. Sterility in tsetse flies (*Glossina morsitans* Westwood) caused by loss of symbionts. *Experientia*, 32, 995-6.
- OAKESON, K. F., GIL, R., CLAYTON, A. L., DUNN, D. M., VON NIEDERHAUSERN, A. C., HAMIL, C., AOYAGI, A., DUVAL, B., BACA, A., SILVA, F. J., VALLIER, A., JACKSON, D. G., LATORRE, A., WEISS, R. B., HEDDI, A., MOYA, A. & DALE, C. 2014. Genome Degeneration and Adaptation in a Nascent Stage of Symbiosis. *Genome Biology and Evolution*, 6, 76-93.

- OLIVER, K. M., DEGNAN, P. H., BURKE, G. R. & MORAN, N. A. 2010. Facultative Symbionts in Aphids and the Horizontal Transfer of Ecologically Important Traits. *Annual Review of Entomology*, 55, 247-266.
- OLIVER, K. M., MORAN, N. A. & HUNTER, M. S. 2005. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 12795-800.
- OLIVER, K. M., RUSSELL, J. A., MORAN, N. A. & HUNTER, M. S. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 1803-1807.
- ONFELT TINGVALL, T., ROOS, E. & ENGSTROM, Y. 2001. The imd gene is required for local Cecropin expression in Drosophila barrier epithelia. *EMBO reports*, 2, 239-43.
- PAILLOT, A. 1933. *L'infection chez les insectes*, Trévoux.
- PANNEBAKKER, B. A., LOPPIN, B., ELEMANS, C. P., HUMBLLOT, L. & VAVRE, F. 2007. Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 213-5.
- PAREDES, JUAN C., WELCHMAN, DAVID P., POIDEVIN, M. & LEMAITRE, B. 2011. Negative Regulation by Amidase PGRPs Shapes the Drosophila Antibacterial Response and Protects the Fly from Innocuous Infection. *Immunity*, 35, 770-779.
- PARKHILL, J., SEBAIHIA, M., PRESTON, A., MURPHY, L. D., THOMSON, N., HARRIS, D. E., HOLDEN, M. T., CHURCHER, C. M., BENTLEY, S. D., MUNGALL, K. L., CERDENO-TARRAGA, A. M., TEMPLE, L., JAMES, K., HARRIS, B., QUAIL, M. A., ACHTMAN, M., ATKIN, R., BAKER, S., BASHAM, D., BASON, N., CHEREVACH, I., CHILLINGWORTH, T., COLLINS, M., CRONIN, A., DAVIS, P., DOGGETT, J., FELTWELL, T., GOBLE, A., HAMLIN, N., HAUSER, H., HOLROYD, S., JAGELS, K., LEATHER, S., MOULE, S., NORBERCZAK, H., O'NEIL, S., ORMOND, D., PRICE, C., RABBINOWITSCH, E., RUTTER, S., SANDERS, M., SAUNDERS, D., SEEGER, K., SHARP, S., SIMMONDS, M., SKELTON, J., SQUARES, R., SQUARES, S., STEVENS, K., UNWIN, L., WHITEHEAD, S., BARRELL, B. G. & MASKELL, D. J. 2003. Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. *Nature genetics*, 35, 32-40.
- PETERSEN, U. M., KADALAYIL, L., REHORN, K. P., HOSHIZAKI, D. K., REUTER, R. & ENGSTRÖM, Y. 1999. Serpentine regulates Drosophila immunity genes in the larval fat body through an essential GATA motif. *The EMBO Journal*, 18, 4013-4022.
- PHILIPS, J. A., RUBIN, E. J. & PERRIMON, N. 2005. Drosophila RNAi Screen Reveals CD36 Family Member Required for Mycobacterial Infection. *Science*, 309, 1251-1253.
- PIERANTONI, U. 1927. L'organo simbiotico nello sviluppo di Calandra oryzae. *Rendiconti della Reale Accademia delle Scienze di Napoli*, 35, 244-250.
- PLARRE, R. 2010. An attempt to reconstruct the natural and cultural history of the granary weevil, Sitophilus granarius (Coleoptera: Curculionidae). *Eur. J. Entomol.*, 107, 1-11.
- PUIG, O., MARR, M. T., RUHF, M. L. & TIJAN, R. 2003. Control of cell number by Drosophila FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes & Development*, 17, 2006-2020.



- RAHNAMAEIAN, M., CYTRYŃSKA, M., ZDYBICKA-BARABAS, A., DOBSLAFF, K., WIESNER, J., TWYMAN, R. M., ZUCHNER, T., SADD, B. M., REGOES, R. R., SCHMID-HEMPEL, P. & VILCINSKAS, A. 2015. *Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria*.
- RAJALINGAM, K., SHARMA, M., PALAND, N., HURWITZ, R., THIECK, O., OSWALD, M., MACHUY, N. & RUDEL, T. 2006. IAP-IAP complexes required for apoptosis resistance of *C. trachomatis*-infected cells. *PLoS pathogens*, 2, e114.
- RAJAN, A. & PERRIMON, N. 2013. Of flies and men: insights on organismal metabolism from fruit flies. *BMC Biology*, 11.
- RÄMET, M., LANOT, R., ZACHARY, D. & MANFRUELLI, P. 2002a. JNK Signaling Pathway Is Required for Efficient Wound Healing in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 241, 145-156.
- RÄMET, M., MANTRUELLI, P., PEARSON, A., MATHEY-PREVOT, B. & EZEKOWITZ, R. A. 2002b. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature*, 416, 644-648.
- RAQUIN, V., VALIENTE MORO, C., SAUCEREAU, Y., TRAN, F.-H., POTIER, P. & MAVINGUI, P. 2015. Native Wolbachia from *Aedes albopictus* Blocks Chikungunya Virus Infection In Cellulo. *PLoS ONE*, 10, e0125066.
- RATZKA, C., GROSS, R. & FELDHAAR, H. 2013. Gene expression analysis of the endosymbiont-bearing midgut tissue during ontogeny of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *Journal of Insect Physiology*, 59, 611-623.
- RATZKA, C., LIANG, C., DANDEKAR, T., GROSS, R. & FELDHAAR, H. 2011. Immune response of the ant *Camponotus floridanus* against pathogens and its obligate mutualistic endosymbiont. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41, 529-36.
- REEVES, E. P., LU, H., JACOBS, H. L., MESSINA, C. G. M., BOLSOVER, S., GABELLA, G., POTMA, E. O., WARLEY, A., ROES, J. & SEGAL, A. W. 2002. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature*, 416, 291-297.
- REGAN, J. C., BRANDÃO, A. S., LEITÃO, A. B., MANTAS DIAS, Â. R., SUCENA, É., JACINTO, A. & ZAIDMAN-RÉMY, A. 2013. Steroid Hormone Signaling Is Essential to Regulate Innate Immune Cells and Fight Bacterial Infection in *Drosophila*. *PLoS Pathog*, 9, e1003720.
- REGGIORI, F., SHINTANI, T., NAIR, U. & KLIONSKY, D. J. 2005. Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy*, 1, 101-9.
- REICHHART, J. M., MEISTER, M., DIMARCQ, J. L., ZACHARY, D., HOFFMANN, D., RUIZ, C., RICHARDS, G. & HOFFMANN, J. A. 1992. Insect immunity: developmental and inducible activity of the *Drosophila* dipterecin promoter. *The EMBO journal*, 11, 1469-77.
- REYNOLDS, S. & ROLFF, J. 2008. Immune function keeps endosymbionts under control. *J Biol*, 7, 28.
- RIDDIFORD, L. M. 2008. Juvenile hormone action: A 2007 perspective. *Journal of Insect Physiology*, 54, 895-901.
- RITSICK, D. R., EDENS, W. A., MCCOY, J. W. & LAMBETH, J. D. 2004. The use of model systems to study biological functions of Nox/Duox enzymes. *Biochemical Society symposium*, 85-96.

- RIZKI, T. M. 1978. *The circulatory system and associated cells and tissues.* , New York, TRF Wright.
- RIZKI, T. M. & RIZKI, R. M. 1992. Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *Leptopilina*. *Developmental and comparative immunology*, 16, 103-110.
- ROBINSON, K. L., TOHIDI-ESFAHANI, D., LO, N., SIMPSON, S. J. & SWORD, G. A. 2011. Evidence for Widespread Genomic Methylation in the Migratory Locust, *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *PLoS ONE*, 6, e28167.
- ROUSSET, F., BOUCHON, D., PINTUREAU, B., JUCHAULT, P. & SOLIGNAC, M. 1992. Wolbachia endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 250, 91-8.
- ROY, S. G. & RAIKHEL, A. S. 2011. The small GTPase Rheb is a key component linking amino acid signaling and TOR in the nutritional pathway that controls mosquito egg development. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41, 62-69.
- RSTUDIO 2012. RStudio: Integrated development environment for R. 0.97.551 ed.
- RUBINSZTEIN, D. C., CODOGNO, P. & LEVINE, B. 2012. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, 11, 709-730.
- RUDEL, T., KEPP, O. & KOZJAK-PAVLOVIC, V. 2010. Interactions between bacterial pathogens and mitochondrial cell death pathways. *Nature reviews. Microbiology*, 8, 693-705.
- RUI, L., VINUESA, C. G., BLASIOLI, J. & GOODNOW, C. C. 2003. Resistance to CpG DNA-induced autoimmunity through tolerogenic B cell antigen receptor ERK signaling. *Nat Immunol*, 4, 594-600.
- RUS, F., FLATT, T., TONG, M., AGGARWAL, K., OKUDA, K., KLEINO, A., YATES, E., TATAR, M. & SILVERMAN, N. 2013. Ecdysone triggered PGRP-LC expression controls *Drosophila* innate immunity. *The EMBO Journal*, 32, 1626-1638.
- RUTSCHMANN, S., JUNG, A. C., ZHOU, R., SILVERMAN, N., HOFFMANN, J. A. & FERRANDON, D. 2000. Role of *Drosophila* IKK gamma in a toll-independent antibacterial immune response. *Nature immunology*, 1, 342-7.
- RYU, J. H., KIM, S. H., LEE, H. Y., BAI, J. Y., NAM, Y. D., BAE, J. W., LEE, D. G., SHIN, S. C., HA, E. M. & LEE, W. J. 2008. Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science*, 319, 777-82.
- SACHS, J. L., SKOPHAMMER, R. G. & REGUS, J. U. 2011. Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 2, 10800-7.
- SAELEN, X., FESTJENS, N., VANDE WALLE, L., VAN GURP, M., VAN LOO, G. & VANDENABEELE, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23, 2861-74.
- SAFFO, M. B. 1992. Coming to terms with a field: Words and concepts in symbiosis. *Symbiosis*, 14, 17-31.
- SAKAHIRA, H., ENARI, M. & NAGATA, S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391, 96-9.
- SAKURAI, M., KOGA, R., TSUCHIDA, T., MENG, X. Y. & FUKATSU, T. 2005. Rickettsia symbiont in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera*. *Applied and environmental microbiology*, 71, 4069-75.

- SALEM, H., FLOREZ, L., GERARDO, N. & KALTENPOTH, M. 2015. An out-of-body experience: the extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 20142957.
- SARNACKI, S. H., CASTAÑEDA, M. D. R. A., LLANA, M. N., GIACOMODONATO, M. N., VALVANO, M. Á. & CERQUETTI, M. C. 2013. Dam Methylation Participates in the Regulation of PmrA/PmrB and RcsC/RcsD/RcsB Two Component Regulatory Systems in *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *PLoS ONE*, 8, e56474.
- SASSERA, D., LO, N., BOUMAN, E. A., EPIS, S., MORTARINO, M. & BANDI, C. 2008. "Candidatus Midichloria" endosymbionts bloom after the blood meal of the host, the hard tick *Ixodes ricinus*. *Applied and environmental microbiology*, 74, 6138-40.
- SCARBOROUGH, C. L., FERRARI, J. & GODFRAY, H. C. 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, 310, 1781.
- SCHULZ, M. H., ZERBINO, D. R., VINGRON, M. & BIRNEY, E. 2012. Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. *Bioinformatics*, 28, 1086-1092.
- SCOTT, G. D. 1969. *Plant Symbiosis*, E. Arnold.
- SECKBACH, J. 2002. *Symbiosis: mechanisms and model systems*, Kluwer Academics Publisher.
- SELSTED, M. E. & OUELLETTE, A. J. 1995. Defensins in granules of phagocytic and non-phagocytic cells. *Trends in Cell Biology*, 5, 114-119.
- SENGER, K., ARMSTRONG, G. W., ROWELL, W. J., KWAN, J. M., MARKSTEIN, M. & LEVINE, M. 2004. Immunity Regulatory DNAs Share Common Organizational Features in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 13, 19-32.
- SHAI, Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1462, 55-70.
- SHAKHMANTSIR, I., MASSAD, N. L. & KENNEL, J. A. 2014. Regulation of cuticle pigmentation in *drosophila* by the nutrient sensing insulin and TOR signaling pathways. *Developmental Dynamics*, 243, 393-401.
- SHI, Y. & MELLO, C. 1998. A CBP/p300 homolog specifies multiple differentiation pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development*, 12, 943-955.
- SHIGENOBU, S., WATANABE, H., HATTORI, M., SAKAKI, Y. & ISHIKAWA, H. 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*, 407, 81-6.
- SHIRANE, M. & NAKAYAMA, K. I. 2002. Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nat Cell Biol*, 5, 28-37.
- SILVERMAN, N., ZHOU, R., ERLICH, R. L., HUNTER, M., BERNSTEIN, E., SCHNEIDER, D. & MANIATIS, T. 2003. Immune activation of NF-kappaB and JNK requires *Drosophila* TAK1. *The Journal of biological chemistry*, 278, 48928-34.
- SILVERMAN, N., ZHOU, R., STOVEN, S., PANDEY, N., HULTMARK, D. & MANIATIS, T. 2000. A *Drosophila* IkappaB kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes & development*, 14, 2461-71.
- SIMMACO, M., MIGNOGNA, G. & BARRA, D. 1998. Antimicrobial peptides from amphibian skin: What do they tell us? *Peptide Science*, 47, 435-450.

- SNYDER, A. K., MCMILLEN, C. M., WALLENHORST, P. & RIO, R. V. 2011. The phylogeny of Sodalis-like symbionts as reconstructed using surface-encoding loci. *FEMS microbiology letters*, 317, 143-51.
- STANKE, M. & MORGENSTERN, B. 2005. AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. *Nucleic Acids Research*, 33, W465-W467.
- STARR, C. & TAGGART, R. 1998. *Biology: The unity and diversity of life*, Belmont, CA, Wadsworth Publishing Co.
- STARR, D. J. & CLINE, T. W. 2002. A host-parasite interaction rescues *Drosophila* oogenesis defects. *Nature*, 418, 76-79.
- STEINER, H. 2004. Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. *Immunological Reviews*, 198, 83-96.
- STOLL, S., FELDHAAR, H., FRAUNHOLZ, M. J. & GROSS, R. 2010a. Bacteriocyte dynamics during development of a holometabolous insect, the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *BMC Microbiology*, 10, 308-308.
- STOLL, S., FELDHAAR, H., FRAUNHOLZ, M. J. & GROSS, R. 2010b. Bacteriocyte dynamics during development of a holometabolous insect, the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *BMC microbiology*, 10, 308.
- STORELLI, G., DEFAYE, A., ERKOSAR, B., HOLS, P., ROYET, J. & LEULIER, F. 2011. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell metabolism*, 14, 403-414.
- STOUTHAMER, R., LUCK, R. F. & HAMILTON, W. D. 1990. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 2424-7.
- STROSCHEIN-STEVENSON, S. L., FOLEY, E., O'FARRELL, P. H. & JOHNSON, A. D. 2005. Identification of *Drosophila* Gene Products Required for Phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol*, 4, e4.
- STUART, L. M., BOULAIS, J., CHARRIERE, G. M., HENNESSY, E. J., BRUNET, S., JUTRAS, I., GOYETTE, G., RONDEAU, C., LETARTE, S., HUANG, H., YE, P., MORALES, F., KOCKS, C., BADER, J. S., DESJARDINS, M. & EZEKOWITZ, R. A. B. 2007. A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome. *Nature*, 445, 95-101.
- STUART, L. M. & EZEKOWITZ, R. A. B. 2005. Phagocytosis: Elegant Complexity. *Immunity*, 22, 539-550.
- SUZUKI, K., KUBOTA, Y., SEKITO, T. & OHSUMI, Y. 2007. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 12, 209-18.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17, 1-14.
- TAKEUCHI, O., HOSHINO, K., KAWAI, T., SANJO, H., TAKADA, H., OGAWA, T., TAKEDA, K. & AKIRA, S. 1999. Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. *Immunity*, 11, 443-451.
- TAKIYA, D. M., TRAN, P. L., DIETRICH, C. H. & MORAN, N. A. 2006. Co-cladogenesis spanning three phyla: leafhoppers (Insecta: Hemiptera: Cicadellidae) and their dual bacterial symbionts. *Molecular Ecology*, 15, 4175-4191.

- TAN, KIRI L., VLISIDOU, I. & WOOD, W. 2014. Ecdysone Mediates the Development of Immunity in the Drosophila Embryo. *Current Biology*, 24, 1145-1152.
- TANAKA, Y., GUHDE, G., SUTER, A., ESKELINEN, E. L., HARTMANN, D., LULLMANN-RAUCH, R., JANSSEN, P. M., BLANZ, J., VON FIGURA, K. & SAFTIG, P. 2000. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*, 406, 902-6.
- TANG, T., LI, X., YANG, X., YU, X., WANG, J., LIU, F. & HUANG, D. 2014. Transcriptional Response of Musca domestica Larvae to Bacterial Infection. *PLoS ONE*, 9, e104867.
- TANIDA, I., MINEMATSU-IKEGUCHI, N., UENO, T. & KOMINAMI, E. 2005. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*, 1, 84-91.
- TANJI, T., HU, X., WEBER, A. N. R. & IP, Y. T. 2007. Toll and IMD Pathways Synergistically Activate an Innate Immune Response in Drosophila melanogaster. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 4578-4588.
- TAUSZIG-DELAMASURE, S., BILAK, H., CAPOVILLA, M., HOFFMANN, J. A. & IMLER, J. L. 2002. Drosophila MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. *Nature immunology*, 3, 91-7.
- TETER, S. A., EGGERTON, K. P., SCOTT, S. V., KIM, J., FISCHER, A. M. & KLIONSKY, D. J. 2001. Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *The Journal of biological chemistry*, 276, 2083-7.
- THUMMEL, C. S. 2001. Molecular Mechanisms of Developmental Timing in C. elegans and Drosophila. *Developmental Cell*, 1, 453-465.
- TOENSHOFF, E. R., GRUBER, D. & HORN, M. 2012. Co-evolution and symbiont replacement shaped the symbiosis between adelgids (Hemiptera: Adelgidae) and their bacterial symbionts. *Environmental Microbiology*, 14, 1284-1295.
- TOJU, H., HOSOKAWA, T., KOGA, R., NIKOH, N., MENG, X. Y., KIMURA, N. & FUKATSU, T. 2010. "Candidatus Curculioniphilus buchneri," a novel clade of bacterial endocellular symbionts from weevils of the genus Curculio. *Applied and environmental microbiology*, 76, 275-82.
- TOKUNAGA, C., YOSHINO, K. & YONEZAWA, K. 2007. mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313, 443-446.
- TOYAMA, T., LEE, H. C., KOGA, H., WANDS, J. R. & KIM, M. 2010. Noncanonical Wnt11 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration. *Molecular cancer research : MCR*, 8, 254-265.
- TRAGER, W. 1986. *Living together, the biology of animal parasitism*, Springer US.
- TSUCHIDA, T., KOGA, R. & FUKATSU, T. 2004. Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science*, 303, 1989.
- TZOU, P., OHRESSER, S., FERRANDON, D., CAPOVILLA, M., REICHHART, J. M., LEMAITRE, B., HOFFMANN, J. A. & IMLER, J. L. 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in Drosophila surface epithelia. *Immunity*, 13, 737-48.
- UICHANCO, L. B. 1924. *Studies on the embryogeny and postnatal development of the Aphididae with special reference to the history of the "symbiotic organ" or "Mycetom"*, Phillip J Science.
- UTTENWEILER-JOSEPH, S., MONIATTE, M., LAGUEUX, M., VAN DORSSELAER, A., HOFFMANN, J. A. & BULET, P. 1998. Differential display of peptides

- induced during the immune response of *Drosophila*: a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 11342-7.
- VAISHNAVA, S., YAMAMOTO, M., SEVERSON, K. M., RUHN, K. A., YU, X., KOREN, O., LEY, R., WAKELAND, E. K. & HOOPER, L. V. 2011. The Antibacterial Lectin RegIII $\gamma$  Promotes the Spatial Segregation of Microbiota and Host in the Intestine. *Science*, 334, 255-258.
- VALLIER, A., VINCENT-MONEGAT, C., LAURENCON, A. & HEDDI, A. 2009. RNAi in the cereal weevil *Sitophilus* spp: Systemic gene knockdown in the bacteriome tissue. *BMC Biotechnology*, 9, 44.
- VAN LEUVEN, J. T. & MCCUTCHEON, J. P. 2012. An AT Mutational Bias in the Tiny GC-Rich Endosymbiont Genome of *Hodgkinia*. *Genome Biology and Evolution*, 4, 24-27.
- VARMA, D., BÜLOW, M. H., PASCH, Y. Y., LOCH, G. & HOCH, M. 2014. Forkhead, a new cross regulator of metabolism and innate immunity downstream of TOR in *Drosophila*. *Journal of insect physiology*, 69, 80-88.
- VAUX, D. L. & STRASSER, A. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 2239-44.
- VIDAL, S., KHUSH, R. S., LEULIER, F., TZOU, P., NAKAMURA, M. & LEMAITRE, B. 2001. Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. *Genes & development*, 15, 1900-12.
- VIGNERON, A., CHARIF, D., VINCENT-MONEGAT, C., VALLIER, A., GAVORY, F., WINCKER, P. & HEDDI, A. 2012. Host gene response to endosymbiont and pathogen in the cereal weevil *Sitophilus oryzae*. *BMC microbiology*, 12 Suppl 1, S14.
- VIGNERON, A., MASSON, F., VALLIER, A., BALMAND, S., REY, M., VINCENT-MONEGAT, C., AKSOY, E., AUBAILLY-GIRAUD, E., ZAIDMAN-REMY, A. & HEDDI, A. 2014. Insects recycle endosymbionts when the benefit is over. *Current biology : CB*.
- VIRGIN, H. W. & LEVINE, B. 2009. Autophagy genes in immunity. *Nature immunology*, 10, 461-470.
- VISVIKIS, O., BOYER, L., TORRINO, S., DOYE, A., LEMONNIER, M., LORÈS, P., ROLANDO, M., FLATAU, G., METTOUCHI, A., BOUVARD, D., VEIGA, E., GACON, G., COSSART, P. & LEMICHEZ, E. 2011. *Escherichia coli* Producing CNF1 Toxin Hijacks Tollip to Trigger Rac1-Dependent Cell Invasion. *Traffic*, 12, 579-590.
- VON DOHLEN, C. D., KOHLER, S., ALSOP, S. T. & MCMANUS, W. R. 2001. Mealybug beta-proteobacterial endosymbionts contain gamma-proteobacterial symbionts. *Nature*, 412, 433-6.
- VORONIN, D., COOK, D. A. N., STEVEN, A. & TAYLOR, M. J. 2012. Autophagy regulates *Wolbachia* populations across diverse symbiotic associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, E1638-E1646.
- VUCIC, D., KAISER, W. J., HARVEY, A. J. & MILLER, L. K. 1997. Inhibition of reaper-induced apoptosis by interaction with inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 10183-10188.
- WALSH, T. K., BRISSON, J. A., ROBERTSON, H. M., GORDON, K., JAUBERT-POSSAMAI, S., TAGU, D. & EDWARDS, O. R. 2010. A functional DNA

- methylation system in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Molecular Biology*, 19, 215-228.
- WANG, J. & DOUGLAS, A. E. 1998. Nitrogen recycling or nitrogen conservation in an alga-invertebrate symbiosis? *The Journal of experimental biology*, 201 (Pt 16), 2445-53.
- WANG, J., WU, Y., YANG, G. & AKSOY, S. 2009. Interactions between mutualist *Wigglesworthia* and tsetse peptidoglycan recognition protein (PGRP-LB) influence trypanosome transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 12133-8.
- WATANABE, K., YUKUHIRO, F., MATSUURA, Y., FUKATSU, T. & NODA, H. 2014. Intrasperm vertical symbiont transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 7433-7437.
- WERNEGREEN, J. J. 2002. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature reviews. Genetics*, 3, 850-61.
- WERNEGREEN, J. J. & MORAN, N. A. 1999. Evidence for genetic drift in endosymbionts (Buchnera): analyses of protein-coding genes. *Molecular biology and evolution*, 16, 83-97.
- WERNER, T., LIU, G., KANG, D., EKENGREN, S., STEINER, H. & HULTMARK, D. 2000. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 13772-13777.
- WEST, H. H. 1979. *Chloroplast symbiosis and development of the ascoglossan opisthobranch Elysia chlorotica*. Northeastern University.
- WHITFIELD, P. J. 1979. *The biology of parasitism: An introduction to the study of associating organisms*.
- WICKER, C. 1983. Differential vitamin and choline requirements of symbiotic and aposymbiotic *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Comp Biochem Physiol*, 76A, 177-182.
- WICKER, C., GUILLAUD, J. & BONNOT, G. 1985. Comparative composition of free, peptide and protein amino acids in symbiotic and aposymbiotic *Sitophilus oryzae* (coleoptera, curculionidae). *Insect Biochemistry*, 15, 537-541.
- WILKINSON, T. L. 1998. The elimination of intracellular microorganisms from insects: an analysis of antibiotic-treatment in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119, 871-881.
- WILKINSON, T. L., ADAMS, D., MINTO, L. B. & DOUGLAS, A. E. 2001. The impact of host plant on the abundance and function of symbiotic bacteria in an aphid. *The Journal of experimental biology*, 204, 3027-3038.
- WILKINSON, T. L., KOGA, R. & FUKATSU, T. 2007. Role of host nutrition in symbiont regulation: impact of dietary nitrogen on proliferation of obligate and facultative bacterial endosymbionts of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Applied and environmental microbiology*, 73, 1362-6.
- WILLIAMS, M. J. 2007. *Drosophila Hemopoiesis and Cellular Immunity*. *The Journal of Immunology*, 178, 4711-4716.
- WU, D., DAUGHERTY, S. C., VAN AKEN, S. E., PAI, G. H., WATKINS, K. L., KHOURI, H., TALLON, L. J., ZABORSKY, J. M., DUNBAR, H. E., TRAN, P. L., MORAN, N. A. & EISEN, J. A. 2006. Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. *PLoS biology*, 4, e188.
- XIANG, G., YANG, Q., WANG, B., SEKIYA, N., MU, X., TANG, Y., CHEN, C.-W., OKADA, M., CUMMINS, J., GHARAIBEH, B. & HUARD, J. 2011. Lentivirus-

- mediated Wnt11 Gene Transfer Enhances Cardiomyogenic Differentiation of Skeletal Muscle-derived Stem Cells. *Molecular Therapy*, 19, 790-796.
- YANG, L., WEISS, T. M., LEHRER, R. I. & HUANG, H. W. 2000. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophysical Journal*, 79, 2002-2009.
- YANG, Z., HUANG, J., GENG, J., NAIR, U. & KLIONSKY, D. J. 2006. Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Molecular biology of the cell*, 17, 5094-104.
- YANO, T., MITA, S., OHMORI, H., OSHIMA, Y., FUJIMOTO, Y., UEDA, R., TAKADA, H., GOLDMAN, W. E., FUKASE, K., SILVERMAN, N., YOSHIMORI, T. & KURATA, S. 2008. Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. *Nat Immunol*, 9, 908-16.
- YEN, J. H. & BARR, A. R. 1973. The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Journal of invertebrate pathology*, 22, 242-50.
- YORIMITSU, T. & KLIONSKY, D. J. 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell death and differentiation*, 12 Suppl 2, 1542-52.
- ZAIDMAN-REMY, A., HERVE, M., POIDEVIN, M., PILI-FLOURY, S., KIM, M. S., BLANOT, D., OH, B. H., UEDA, R., MENGIN-LECREULX, D. & LEMAITRE, B. 2006. The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity*, 24, 463-73.
- ZASLOFF, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-395.
- ZCHORI-FEIN, E., GOTTLIEB, Y., KELLY, S. E., BROWN, J. K., WILSON, J. M., KARR, T. L. & HUNTER, M. S. 2001. A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 12555-60.
- ZCHORI-FEIN, E. & PERLMAN, S. J. 2004. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Molecular ecology*, 13, 2009-16.
- ZERBINO, D. R. & BIRNEY, E. 2008. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, 18, 821-829.
- ZHANG, G. & GHOSH, S. 2002. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem*, 277, 7059-65.
- ZHANG, X., ZHENG, Y., JAGADEESWARAN, G., REN, R., SUNKAR, R. & JIANG, H. 2014. Identification of conserved and novel microRNAs in *Manduca sexta* and their possible roles in the expression regulation of immunity-related genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 47, 12-22.
- ZHU, L., WANG, L., LUO, X., ZHANG, Y., DING, Q., JIANG, X., WANG, X., PAN, Y. & CHEN, Y. 2012. Tollip, an Intracellular Trafficking Protein, Is a Novel Modulator of the Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 39653-39663.



# ANNEXES – CHAPITRE 1

Table S1. Séquences des amers utilisés pour la synthèse de matrices ARNdb (T7) et pour la quantification de transcrits par RT-qPCR.

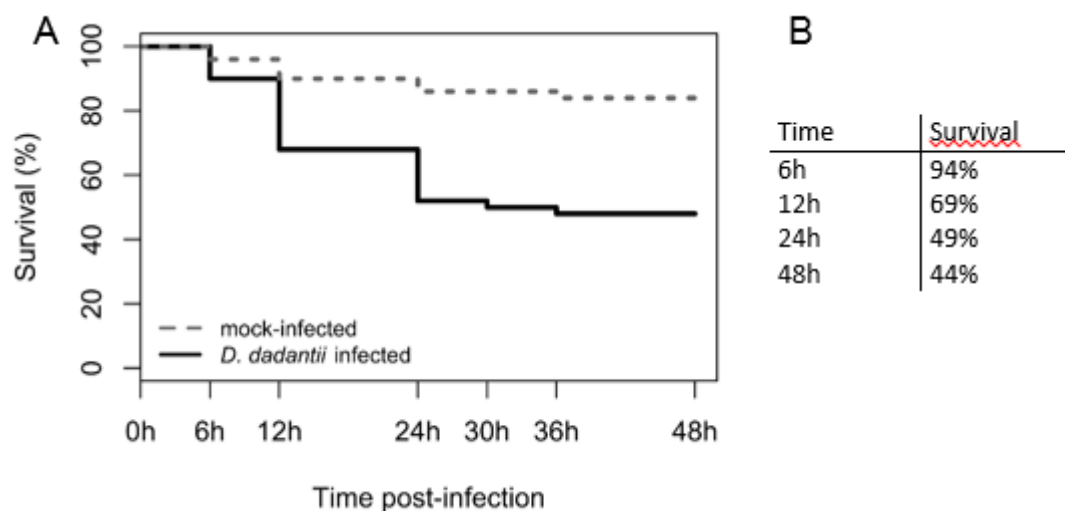
Primers	Sequence (5'-3')	T°C (4GC+2AT°)
5'-GFP-T7	TAATACGACTCACTATAGGGCAAGGAGGACGGCAACATCC	64
3'-GFP-T7	TAATACGACTCACTATAGGGATTTATGTTTCAGGTTTCAG	52
5'-IMD-T7	TAATACGACTCACTATAGGGGTCTCTCAAGGGACCAAAAT	60
3'-IMD-T7	TAATACGACTCACTATAGGGGTGCTTCAGCCAAACTCCT	60
5'-IMD	ACAGGAGCAGTTTTCGTTTCG	60
3'-IMD	GTTCAACCTTTGGGGTTCC	58
5'-TollIP-T7	TAATACGACTCACTATAGGGGACCCTAATGGTGGAAGAA	60
3'-TollIP-T7	TAATACGACTCACTATAGGGGACTCCTCCGTTTCTGTTGG	62
5'-TollIP	AAGAGCGACGCAATAGGGT	58
3'-TollIP	CATTAGGGTCCGTAGGTGT	58
5'-Relish-T7	TAATACGACTCACTATAGGGCCAACATGGCGGATCCCATA	62
3'-Relish-T7	TAATACGACTCACTATAGGGCGGGTGACGCTTAAACCATC	62
5'-Relish	CCAACATGGCGGATCCCATA	62
3'-Relish	CGGGTGACGCTTAAACCATC	62
5'-fk506bp-T7	TAATACGACTCACTATAGGGACACCCATACGCACAGTGAA	60
3'-fk506bp-T7	TAATACGACTCACTATAGGGCGGACTGCTTCTTTCCAGA	60
5'-fk506bp	AAAGACCGAGGAACTGCAAA	58
3'-fk506bp	TAGAGCCTTTGTAGCGGCA	58
5'-megwb-T7	TAATACGACTCACTATAGGGGCCAAAACCAAGCCACTTA	58
3'-megwb-T7	TAATACGACTCACTATAGGGGTGTCGGGACTCCTTTCTTTG	60
5'-megwb	GCCAAAACCAAGCCACTTA	58
3'-megwb	TGTCGGGACTCCTTTCTTTG	60
5'-colA	GAATAGATACAACGGGGGTCA	62
3'-colA	CTACCATCTGACACTTCCTC	60
5'-colB	CAGTTACATTTGCCCCCTA	60
3'-colB	GGCTGCTGGGTCTCTAATA	62

## ANNEXES – CHAPITRE 2

Table S1. Primer sequences used for RT-qPCR

qRT-PCR primers	Sequence (5'-3')	T°C (4GC+2AT)
5-Caudal	GCAACTCTGGGTCTATCTGAG	64
3-Caudal	TTCGTGGAGAAACCTCTGC	62
5-Cecropin	GTCCTGTTAGTTGTGGCAGTA	62
3-Cecropin	TTATCTTCCAGGCACCAATCC	62
5-ColeoptericaA	GAATAGATACAACGGGGGTCA	62
3-ColeoptericaB	CTACCATCTGACACTTCCTC	60
5-Coleopterica-B	CAGTTACATTTGCCCCCTA	60
3-Coleopterica-B	GGCTGCTGGGTCCTCTAATA	62
5-Defensin	AAGATGCATTCACAGTTGCG	58
3-Defensin	TTGCCCTTTTCACACGTACA	58
5-diptericin	CTCCGATTTCAAGCCGACAG	62
3-diptericin	GGACCGTTTGACCATACTGG	62
5-FK506BP	ATTAATCCCGGAGACGGTTC	60
3-FK506BP	CGACACTCATCTGGGCTAC	60
5-GNBP	CTGGATTAACTCGCCAAGA	58
3-GNBP	ACTGTCTTTCCAAGAGGGCA	60
5-Imd	ACAGGAGCAGTTTTCGTTCG	60
3-Imd	GTTCAACCTTTGGGGTTCC	58
5-Pirk	GAAGGTTCCAAGTTTTGTGC	58
3-Pirk	TTTCGGAGTGGTCAAGGTGG	62
5-Relish	ACATGCTTTTGAGCAATCCC	58
3-Relish	CCGACCACTGATTCTCCACT	62
5-Sarcotoxin	AGTCACAAAGGAACAATTTGG	60
3-Sarcotoxin	AGAAGCCGTACGTCCGTTT	64
5-Toll	TGCGTAAAAGTATTGGGGGC	60
3-Toll	TCAGTTTGGAATGGCTGGAC	60

5-Tollip	AAGAGCGACGCAATAGGGT	58
3-Tollip	CATTAGGGTCCGTAGGTGT	58
5-wPGRP1	ATAATTTGCTGTTGGAGGG	58
3-wPGRP1	TCTCGGACTTGCCTATGACC	62
5-wPGRP2	TGCAAGGCCTGCCCTTAGT	60
3-wPGRP2	GTGCCATCTCCTCCAATCAT	60
5-wPGRP3	TTATGAAGGAGCTGGATGGC	60
3-wPGRP3	TAACTTGCCGACCTCCAAAC	60
5-Gapdh	AAC TTG CCGACAGCCTTGG	62
3-Gapdh	GCGCCCATGTATGTAGTTGG	62
5-RPL29	TGGCCAAGTCCAAGAATCACA	62
3-RPL29	TTCTTGCGCTAGCTTGCTT	62



**Figure S1 Survival of symbiotic *S. oryzae* larvae after *D. dadantii* injection.** A. Survival assay of *D. dadantii* infected larvae versus mock-infected larvae over the course of the infection. One representative experiment out of three is shown. B. Survival proportion of infected larvae at critical time points of the infection course (6 h, 12 h, 24 h, 48 h). Data are the mean of three repetitions.

**Table S2 – Factor effect significance on antimicrobial peptide coding gene expression (attached to Fig.1 and Fig. 3).** Treatment is a 3-levels categorical variable representing the injection of sterile PBS (control), *M. luteus* or *D. dadantii*. Time is the time post-infection, considered as a 4-levels categorical variable. Significance is assessed using a linear model on log-transformed gene expression data. P-values < 0,05 are highlighted with a light grey background and p-values <0,01 with a dark grey background.

	p-values					
	Humoral response			Bacteriome response		
	Treatment	Time	Interaction	Treatment	Time	Interaction
<b>Coleopteracin A</b>	<0,0001	<0,0001	0,0017	<0,0001	<0,0001	0,0010
<b>Coleopteracin B</b>	<0,0001	<0,0001	0,1010	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<b>Sarcotoxin</b>	<0,0001	<0,0001	0,0114	<0,0001	<0,0001	0,0099
<b>Diptericin</b>	<0,0001	<0,0001	0,0017	<0,0001	<0,0001	0,0495
<b>Cecropin</b>	<0,0001	<0,0001	0,1131	<0,0001	<0,0001	0,0002
<b>Defensin</b>	<0,0001	<0,0001	0,2050	<0,0001	<0,0001	0,0008

**Table S3 – Contrast analysis of the factor “Treatment” across the time post-infection for antimicrobial peptide coding genes (attached to Fig.1 and Fig. 3).**

The contrast analysis allows to make pairwise comparisons of immune-related gene expression between treatments (*i.e.* sterile PBS injection [P], *M. luteus* infection [M] or *D. dadantii* infection [D]) at the different times. For each given time, a t-test has been performed on the linear model coefficients for pairwise contrasts of each level of the factor “Treatment”.

" " = p-value > 0,05 ; "\*" = p-value < 0,05 ; "\*\*\*" = p-value < 0,01 ; "\*\*\*\*" = p-value < 0,001.

NS means that the global linear model analysis indicated not significant effect of the factor “Treatment”. The color of the boxes indicates the sign of the difference of means between the two levels of treatment. A white box for A - B contrast indicates A>B ; a grey box indicates B>A.

Sarcotoxin									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M	***	***	***	***	P - M	***	***	***	***
P - D	***	***	***	***	P - D	***	***	***	***
M - D				*	M - D				*
Coleopteracin A									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M	**	*	***	***	P - M	***	***	***	***
P - D	***	***	***	***	P - D	***	***	***	***
M - D			*	*	M - D				**
Coleopteracin B									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M	***				P - M	***	***		***
P - D	***				P - D	***	***	***	***
M - D					M - D			**	***
Diptericin									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M	***				P - M	***	***	***	***
P - D	***				P - D	***	***	***	***
M - D					M - D			*	
Cecropin									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M	***				P - M	***	***	***	***
P - D	***				P - D	***	***	***	***
M - D					M - D				
Defensin									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M	***				P - M	***	***	***	***
P - D	***				P - D	***	***	***	***
M - D					M - D				**

**Table S4 – Factor effect significance on immune-related regulatory and pathway gene expression (attached to Fig.4).** Treatment is a 3-levels categorical variable representing the injection of sterile PBS (control), *M. luteus* or *D. dadantii*. Time is the time post-infection, considered as a 4-levels categorical variable. Significance is assessed using a linear model on log-transformed gene expression data. P-values < 0,05 are highlighted with a light grey background and p-values <0,01 with a dark grey background.

	p-values					
	Humoral response			Bacteriome response		
	Treatment	Time	Interaction	Treatment	Time	Interaction
<b>GNBP1</b>	0,0003	<0,0001	0,0345	0,4225	<0,0001	0,0062
<b>wPGRP3</b>	<0,0001	<0,0001	0,0234	0,0300	<0,0001	0,5024
<b>toll</b>	0,0011	0,6261	0,0508	<0,0001	<0,0001	0,0008
<b>wPGRP2</b>	<0,0001	0,1167	0,0006	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<b>imd</b>	0,3442	0,1344	0,1287	0,0002	<0,0001	<0,0001
<b>relish</b>	<0,0001	<0,0001	0,0908	<0,0001	<0,0001	0,1795
<b>wPGRP1</b>	<0,0001	<0,0001	0,0677	0,1071	<0,0001	0,0237
<b>caudal</b>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0706	0,7195	0,9149
<b>pirk</b>	<0,0001	<0,0001	0,0006	<0,0001	0,0072	0,0429
<b>fk506bp</b>	0,1043	0,6603	0,6973	<0,0001	0,3296	0,9742
<b>tollip</b>	0,0005	0,2207	0,1223	<0,0001	0,0002	0,0005

**Table S5 – Contrast analysis of the factor “Treatment” across the time post-infection for immune-related regulatory and pathway gene (attached to Fig.4).**

The contrast analysis allows to make pairwise comparisons of immune-related gene expression between treatments (*i.e.* sterile PBS injection [P], *M. luteus* infection [M] or *D. dadantii* infection [D]) at the different times. For each given time, a t-test has been performed on the linear model coefficients for pairwise contrasts of each level of the factor “Treatment”.

" " = p-value > 0,05 ; "\*" = p-value < 0,05 ; "\*\*\*" = p-value < 0,01 ; "\*\*\*\*" = p-value < 0,001.

NS means that the global linear model analysis indicated not significant effect of the factor “Treatment”. The color of the boxes indicate the sign of the difference of means between the two levels of treatment. A white box for A-B contrast indicates A>B ; a grey box indicates B>A.

GNBP1									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M			***	*	P - M	NS			
P - D			***	*	P - D				
M - D					M - D				
toll									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M	*	***			P - M		***		***
P - D		***			P - D	*		*	***
M - D					M - D	*	***	*	**
imd									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M	NS				P - M	***	***		
P - D					P - D	***	***		
M - D					M - D				
wPGRP1									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M			***	***	P - M	NS			
P - D	***	***	***	***	P - D				
M - D		***	**		M - D				
pikr									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M	***		***	***	P - M	***	**	***	***
P - D	***	***	***	***	P - D	***	***	***	***
M - D		**			M - D		**		
tollip									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M					P - M	***	**		
P - D	**				P - D	***	***		
M - D	**				M - D				

wPGRP3									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M			***	***	P - M	NS			
P - D		*	***	***	P - D				
M - D					M - D				
wPGRP2									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M			***	***	P - M	NS			
P - D		**	***	***	P - D				
M - D			*	***	M - D				
relish									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M	***		***	***	P - M	*			
P - D	***	***	***	***	P - D	***			
M - D		*			M - D	*			
caudal									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M				**	P - M	NS			
P - D		***	***		P - D				
M - D		***	***		M - D				
fk506bp									
Humoral					Bacteriome				
	2h	6h	12h	24h		2h	6h	12h	24h
P - M	NS				P - M	*			
P - D					P - D	***			
M - D					M - D	***			

## ANNEXES – CHAPITRE 3

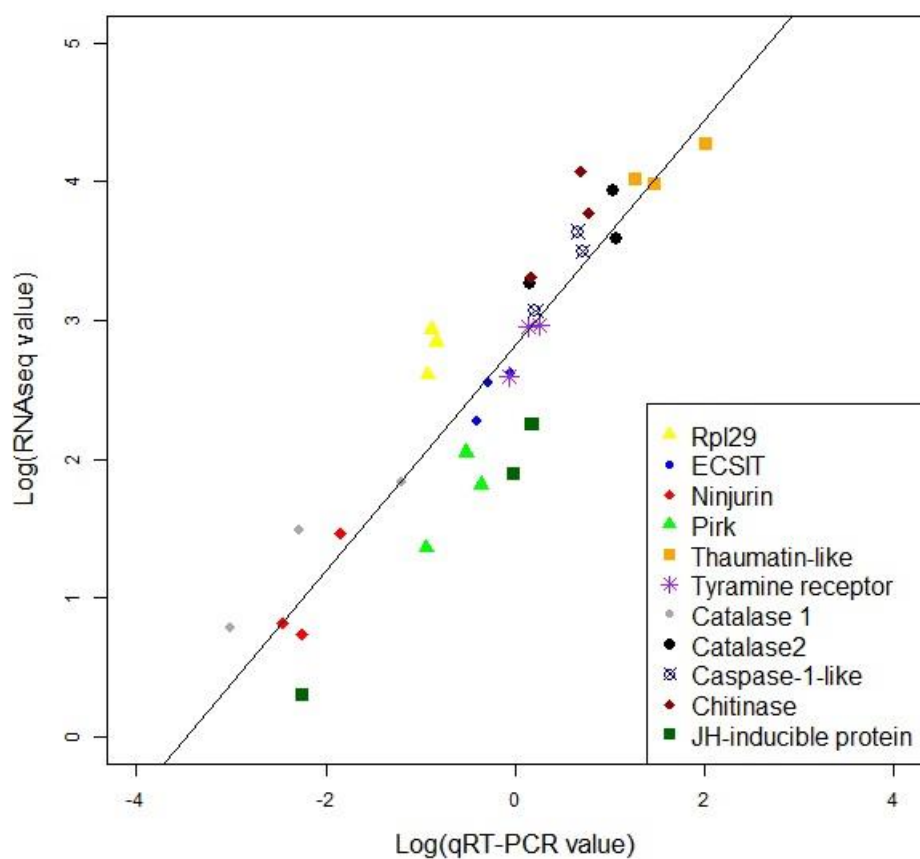


Figure S1 Correlation analysis of RNAseq and RTqPCR transcript quantification

**Table S1** (next page) First blast hit and featured domains of the newly published transcript sequences.

Characteristics of sequences used in study									
Accession number	Reference name	Size of sequence based on the longest ORF	First Blastx hit	Related species	Accession number	e-value	Query coverage	Max identity	Interproscan domains
FQ881177	ATG4	1113	ATG4B	<i>Tribolium castaneum</i>	XP_972923	4,00E-173	97%	67%	IPR005078
FQ872501	ATG6	640	beclin_1_like protein	<i>Tribolium castaneum</i>	EFA06871.1	3,00E-64	94%	61%	IPR007243
KR998316	Caspase like 1	1024	caspase-1	<i>Bombyx mori</i>	NP_001037050.1	6,00E-07	26%	35%	no data
KR998317	catalase1	1546	PREDICTED: catalase	<i>Tribolium castaneum</i>	XP_970103.1	0,0	94%	73%	IPR011614/IPR018028
KR998318	catalase2	307	catalase	<i>Aedes aegypti</i>	ABF18150.1	6,00E-42	95%	65%	IPR010582/IPR018028
FQ870561	cecropin	210	hypothetical antimicrobial peptide	<i>Sitophilus zeamais</i>	ABZ80668	2,00E-28	98%	91%	no data
KR998312	Chitinase	1486	chitinase	<i>Holotrichia oblita</i>	AID55216.1	8,00E-116	82%	52%	IPR029070
FQ880455	coleoptericin A	378	coleoptericin 1	<i>Sitophilus zeamais</i>	ABZ80661	1,00E-57	99%	91%	IPR009382
FQ861122	coleoptericin B	348	coleoptericin 2	<i>Sitophilus zeamais</i>	ABZ80667	2,00E-54	98%	96%	IPR009382
FQ878880	c-type lysozyme	441	c-type lysozyme	<i>Sitophilus zeamais</i>	ABZ80664	9,00E-78	99%	97%	IPR001916/IPR023346
FQ871672	Ecsit	1150	PREDICTED: evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway, mitochondrial isoform X1	<i>Tribolium castaneum</i>	XP_970998.1	3,00E-141	92%	61%	IPR010418/IPR029342
FQ868712	ecdysone inducible gene L2	633	ecdysone-inducible gene L2 isoform X2	<i>Tribolium castaneum</i>	XP_008194972.1	5,00E-68	89%	50%	IPR003599



FQ866942	gapdh	1003	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Spodoptera frugiperda</i>	AGH14258.1	8,00E-174	99%	88%	IPR020829
FQ882813	IAP2	585	inhibitor of apoptosis 2	<i>Tribolium castaneum</i>	NP_001280519.1	3,00E-54	98%	51%	IPR001370
FQ876170	IAP3	366	inhibitor of apoptosis	<i>Spodoptera littoralis</i>	CAM96614	4,00E-14	72%	55%	IPR001370
KR998313	JH-inducible-protein	210	JH-inducible-protein	<i>Galleria mellonella</i>	AAK07569.1	7,00E-06	68%	53%	no data
KR998321	Ninjurin	919	PREDICTED: ninjurin-1-like	<i>Musca domestica</i>	XP_005181531.1	8,00E-47	58%	55%	IPR007007
KM034777	Pirk	552	poor Imd response upon knock-in, isoform A	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_611598.1	3,00E-08	47%	35%	no data
FQ879551	RPL29	223	ribosomal protein L29e	<i>Curculio glandium</i>	CAU17405.1	5,00E-37	98%	89%	IPR002673
FQ882365	sarcotoxin	588	hypothetical antimicrobial peptide	<i>Sitophilus zeamais</i>	ABZ80663	3,00E-90	92%	97%	IPR005521
KR998319	Thaumatin-like	743	PREDICTED: pathogenesis-related protein 5	<i>Tribolium castaneum</i>	XP_975175.1	2,00E-112	97%	66%	IPR001938
KR998320	Tyramine receptor	1369	tyramine/octopamine receptor	<i>Tribolium castaneum</i>	NP_001164311.1	8,00E-172	87%	66%	IPR002002/IPR017452
KR998314	wnt7	268	PREDICTED: protein Wnt-7b	<i>Tribolium castaneum</i>	XP_008196351.1	4,00E-36	99%	75%	IPR005817
KR998315	wnt11	252	Protein Wnt-11	<i>Zootermopsis nevadensis</i>	KDR22144.1	5,00E-27	82%	55%	IPR005817

Table S2 Primers used for RTqPCR experiments.

qRT-PCR primers	Sequence (5'-3')	T°C (4GC+2AT°)
5- ATG4	TCCAGCGACATCACAGCTAC	62
3- ATG4	CTTCGCTTCTACATAGCCG	62
5- ATG6	TTGACCAGTATGTGCCTCCA	58
3- ATG6	TGTGCATT CATCGCAAAGAG	58
5- Caspase like 1	CCAATTTT GCCGCTCAAGAAGA	58
3- Caspase like 1	GTTCCGTGACGTACCGTTTT	60
5- Catalase1	GCCCATTGCTGT CAGATTTT	58
3- Catalase1	TCACCGGATTTCTTTT GAGG	58
5- Catalase2	TATGGGACTTGGTAGGAAACAA	58
3- Catalase2	TCTGTAGCCATTCGGGATTC	60
5- Cecropin	GTCTGT TAGTTGTGGCAGTA	62
3- Cecropin	TTATCTTCCAGGCACCAATCC	62
5- Chitinase	GGTTTCTGGGGTTACAACGA	60
3- Chitinase	CTGTTTCCAATGACCAAAGCA	58
5- Coleopteracin A	GAATAGATACAACGGGGGTCA	62
3- Coleopteracin A	CTACCATCTGACACTTCCTC	60
5- Coleopteracin B	CAGTTACATTTGCCCCCTA	60
3- Coleopteracin B	GGCTGCTGGGTCTCTAATA	62
5- c-type lysozyme	GCGGGGAAAAAAGTGGCGTA	62
3- c-type lysozyme	CCATCGGGATTGTGGTTTTAG	62
5- Ecsit	ATTGGATGCCAAGGTTCAAG	58
3- Ecsit	GACCTTCCACAAAATCGGA	58
5-ecdysone inducible gene L2	TGATCGATCGTACAGTGGGA	60
3-ecdysone inducible gene L2	GGTGAGCGCCTAAAATCTTG	60
5- Gapdh	AACTTTGCCGACAGCCTTGG	62
3- Gapdh	GCGCCCATGTATGTAGTTGG	62
5- IAP2	TGCGCTCCCAGAAGTCTATT	60
3- IAP2	GAATGGTTGTTGCAGTCGT	58
5- IAP3	TCATGACAAAGGGACAATGC	58
3- IAP3	TGAAAACCTTCGATTCCTGG	58
5- JH inducible protein	AAAATCATTCAAGATGCCCCG	56
3- JH inducible protein	GCAATTTCCATGATGGGTTC	58
5- Ninjurin	CCAGACTGGGTCCAGATGAT	62
3- Ninjurin	AATCTGGAATGGTCTCACCG	60
5- Pirk	ATTCGGAGTGGTCAAGGTG	60
3- Pirk	CTACCATCTGACACTTCCTC	62
5- RPL29	TGGCCAAGTCCAAGAATCACA	62
3- RPL29	TTCTTGGCGCTAGCTTGTCTT	62
5- Sarcotoxin	AGTCACAAAGGAACAATTTTGG	60
3- Sarcotoxin	AGAAGCCGT CACGTCCGTTT	64
5- Thaumatin-like	GTACAGCTGCAAACAAGCCA	60
3- Thaumatin-like	TGTGGTCGT CGTAAGCGTAG	62
5- Tyramine receptor	ACTACACCACCATCTTCGGC	62
3- Tyramine receptor	TTGTCCCACAACGGAGTACA	58
5- Wnt7	ATAAAGCCGGCAGGAAGATT	58
3- Wnt7	CCTGGCATTTAGGTAATGG	58
5- Wnt11	GAAGATTGTGCAACGTGTCC	60
3- Wnt11	TAAGCACTCATGAACCTGCG	58

**Table S3 – Statistical analysis of the factor “Symbiotic status” across the time for RTqPCR transcript quantification.**

P-values are generated by a Generalized Linear Model with Gamma/link inverse transformation fitted to the data and analyzed using a two-way ANOVA with Chi-square test.

" " = p-value > 0,05 ; "\*" = p-value < 0,05 ; "\*\*\*" = p-value < 0,01 ; "\*\*\*\*" = p-value < 0,001.

gene	factor	p-value	
<i>wnt7</i>	symbiosis	5e-4	***
	time	0.70848	
	interaction	0.01500	*
<i>wnt11</i>	symbiosis	2e-9	***
	time	6e-5	***
	interaction	0.36390	
<i>eigl2</i>	symbiosis	0.07742	
	time	1e-06	***
	interaction	0.38204	
<i>jhip</i>	symbiosis	9e-5	***
	time	< 2e-16	***
	interaction	1e-14	***
<i>atg4</i>	symbiosis	0.01387	*
	time	3e-07	***
	interaction	0.44290	
<i>atg6</i>	symbiosis	6e-13	***
	time	0.004608	**
	interaction	0.725613	
<i>iap2</i>	symbiosis	5e-13	***
	time	0.001779	**
	interaction	0.004325	**
<i>iap3</i>	symbiosis	0.510134	
	time	0.142197	
	interaction	0.001858	**

<i>pirk</i>	symbiosis	0.03966	*
	time	2e-06	***
	interaction	0.00107	**
<i>ecsit</i>	symbiosis	< 2e-16	***
	time	< 2e-16	***
	interaction	< 2e-16	***
<i>coleoptericin A</i>	symbiosis	< 2e-16	***
	time	0.04327	*
	interaction	0.39119	
<i>coleoptericin B</i>	symbiosis	0.004198	**
	time	0.929357	
	interaction	0.609963	
<i>sarcotoxin</i>	symbiosis	2e-14	***
	time	0.1616	
	interaction	0.4765	
<i>cecropin</i>	symbiosis	0.3337	
	time	0.3622	
	interaction	0.1373	
<i>thaumatin</i>	symbiosis	< 2e-16	***
	time	< 2e-16	***
	interaction	< 2e-16	***
<i>c-type lysozyme</i>	symbiosis	0.8290	
	time	0.0976	
	interaction	0.2610	

FOLIO ADMINISTRATIF

THÈSE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUÉES DE LYON

NOM : MASSON Prénoms : Florent		DATE de SOUTENANCE : 30/11/15
TITRE : <b>Régulations immunitaires et cellulaires impliquées dans le maintien et le contrôle des bactéries endosymbiotiques du charançon des céréales du genre <i>Sitophilus</i> spp.</b>		
NATURE : Doctorat Ecole doctorale : Évolution, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation Spécialité : Micro-organismes, Interactions, Infections		Numéro d'ordre : 2015ISAL0116
Code B.I.U. – Lyon : T	/ et bis	CLASSE :
<p><b>RESUMÉ :</b> Plusieurs insectes se développant dans des milieux nutritionnellement déficients vivent en symbiose durable avec des bactéries intracellulaires (endosymbiotes) qui complètent leur alimentation et améliorent leur pouvoir adaptatif. Alors que ces associations ont été largement étudiées sur les plans physiologiques et évolutifs, peu de travaux se sont consacrés à l'étude des mécanismes impliqués dans la tolérance et le contrôle des endosymbiotes par l'hôte. L'objectif de cette thèse est d'étudier, chez les charançons des céréales du genre <i>Sitophilus</i>, les particularités moléculaires et immunitaires du bactériome, un organe que l'insecte développe pour héberger les symbiotes et les isoler de sa réponse immunitaire systémique. Le bactériome du charançon exprime une réponse immunitaire modulée : des études transcriptomiques ont montré que les effecteurs de l'immunité sont peu exprimés dans cet organe, à l'exception d'un gène codant un peptide antimicrobien, la coléoptéricine A. Cette dernière interagit avec les endosymbiotes et participe à leur confinement intracellulaire. Dans une première partie, j'ai montré avec une approche d'interférence à l'ARN que l'expression du gène <i>colA</i> serait contrôlée par un système original qui impliquerait les gènes <i>relish</i> et <i>tollip</i>. Cette régulation « interne » au bactériome semble assurer le maintien des endosymbiotes et l'homéostasie de l'organe. Afin de comprendre comment le bactériome répond à une infection par les bactéries exogènes, j'ai suivi par RT-qPCR l'expression de gènes effecteurs de l'immunité dans le bactériome après injection systémique de bactéries à Gram positif ou négatif. Ceci a mis en évidence une réponse « externe », induite en cas d'infection, et qui aurait un rôle de protection des endosymbiotes contre les bactéries exogènes. Enfin, je me suis consacré à l'étude des changements de régulation accompagnant le passage du stade larvaire au stade adulte, marqué par une symbiose très dynamique. Le nombre d'endosymbiotes augmente fortement pendant les premiers jours de vie imaginale, puis diminue jusqu'à leur élimination complète par recyclage autophagique. Une analyse RNAseq a permis d'identifier les voies de signalisation dont l'activité accompagne cette dynamique. Une approche de RT-qPCR a également montré que l'immunité du bactériome est maintenue à un faible niveau d'activation pendant tout le processus de recyclage. Ce travail montre qu'au cours de leur évolution, les insectes ont sélectionné plusieurs stratégies pour assurer le maintien et l'ajustement de leur charge endosymbiotique en fonction de leurs besoins physiologiques : une signalisation immunitaire assurerait le confinement intracellulaire des endosymbiotes, et un ensemble de processus cellulaires incluant l'apoptose et l'autophagie semble être en associé aux voies métaboliques pour assurer le contrôle de la dynamique bactérienne et garantir le compromis bénéfice/coût de la symbiose.</p>		
MOTS CLES : endosymbiose obligatoire, immunité innée, peptide anti-microbien, coléoptéricine, insecte, <i>Sitophilus</i>		
Laboratoire de recherche :	Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions (BF2I) UMR 203 INRA/INSA de Lyon	
Directeur de thèse :	A. Heddi	
Président du jury :		
Composition du jury :	Rapporteurs : B. Lemaitre et C. Braquart-Varnier Examineurs : C. Masson-Boivin et C. Valiente-Moro	